

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

RESPUESTA DEL PERSIMOM *Diospyros kaki* L. VAR. HACHIYA AL CULTIVO DE  
TEJIDOS *In Vitro*



JOSÉ RAÚL ASPUACA AXPUC  
GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2004

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**RESPUESTA DEL PERSIMOM *Diospyros kaki* L. VAR. HACHIYA AL CULTIVO DE  
TEJIDOS *In Vitro***

**TESIS**

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**JOSÉ RAÚL ASPUACA AXPUAC**

**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**EN EL GRADO ACADÉMICO DE**

**LICENCIADO**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2004**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RECTOR**

**Dr. M.V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

<b>DECANO</b>	<b>Dr. ARIEL ABDERRAMAN ORTIZ LÓPEZ</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Ing. Agr. PEDRO PELÁEZ REYES</b>
<b>VOCAL PRIMERO</b>	<b>Ing. Agr. ALFREDO ITZEP MANUEL</b>
<b>VOCAL SEGUNDO</b>	<b>Ing. Agr. MANUEL DE JESÚS MARTINEZ OVALLE</b>
<b>VOCAL TERCERO</b>	<b>Ing. Agr. ERBERTO RAÚL ALFARO ORTIZ</b>
<b>VOCAL CUARTO</b>	<b>Prof. JUVENCIO CHOM CANIL</b>
<b>VOCAL QUINTO</b>	<b>Prof. BAYRON GEOVANY GONZALEZ CHAVAJAY</b>

Guatemala, noviembre de 2004

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores representantes:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**RESPUESTA DEL PERSIMOM *Diospyros kaki* L. VAR. HACHIYA AL CULTIVO DE  
TEJIDOS *In Vitro***

Como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el presente trabajo de investigación satisfaga a los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato agradecerles la atención a la presente.

Atentamente

---

José Raúl Aspuaca Axpucac

## ACTO QUE DEDICO

**A:**

**JESÚS:**

Por ser quien me ha fortalecido y brindado la sabiduría necesaria para alcanzar ésta meta.

**MIS PADRES:** Macario de Jesús Aspuaca y María Santos Axpucac de Aspuaca

Por haberme brindado apoyo incondicional durante mis estudios y el hecho de no dejarme desfallecer en los momentos más difíciles, sus sabios consejos, su paciencia y duro trabajo para alcanzar juntos ésta meta que hoy se hace realidad.

**MIS HERMANOS:** María Luisa, Emilia, José Rodolfo y Floridalma.

Por su apoyo incondicional, con quienes comparto mis éxitos.

**MIS SOBRINOS:** Luis Pedro, Héctor José, Ariel Andrés, Gonzalo Aldair, Emilia María y Alba Magnolia.

**MI ABUELOS:** Cecilio y Baltasar (Que en paz descansen), Juana y Eulalia.

**MIS TÍOS:** Patrocinia, José Gorgóneo, Ambrosio, Jenaro, Amelia y Jaime.

**MIS CUÑADOS:** Héctor Albino y Gonzalo Fidel.

Con respeto y cariño

**MIS AMIGOS:** Por los momentos compartidos y muestra de su sincera amistad.

## TESIS QUE DEDICO

**A:**

Guatemala.

Escuela Lázaro Axpucá.

Colegio Liceo Antigüeno.

Facultad de Agronomía.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Todas aquellas personas que contribuyeron en mi formación.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A:**

Mi asesor de tesis Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte, por su valiosa ayuda y colaboración brindada en la realización del presente trabajo de investigación.

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez e Ing. Agr. Mak Milán Cruz por su valiosa ayuda brindada en la realización del presente trabajo de investigación.

Fundación Visión Mundial y Amistad Regional por su valioso apoyo brindado.

## CONTENIDO GENERAL

	Página.
CONTENIDO GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 MARCO CONCEPTUAL.....	3
3.1.1 Micropropagación.....	3
3.1.2 Cultivo de tejidos.....	4
3.1.3 Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> .....	4
A. Reacciones de hipersensibilidad en las plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	4
3.1.4 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> .....	6
A. Órganos con crecimiento determinado (hojas, flores y frutos).....	7
B. Órganos con crecimiento indeterminado (ápices de tallo y de raíz).....	7
C. Cultivo de embriones.....	10
D. Cultivo de células desorganizadas .....	10
E. Cultivo de protoplastos.....	11
3.1.5 Explante .....	12
A. Tamaño del explante .....	12
B. Asepsia del explante.....	13
3.1.6 Medio de cultivo .....	14
A. Sales inorgánicas.....	14
B. Vitaminas .....	16
C. Reguladores del crecimiento .....	17
D. Aminoácidos .....	22
E. Carbohidratos .....	22
F. Agua.....	23
G. Agentes solidificantes.....	23
H. Suplementos no definidos.....	23
3.1.7 Medios más comunes utilizados para el cultivo de tejidos vegetales .....	24
3.2 MARCO REFERENCIAL .....	24
3.2.1 Origen del persimón .....	24
3.2.2 Clasificación botánica.....	25
3.2.3 Descripción botánicas del genero Diospyros.....	25
A. Habito.....	25
B. Ubicación .....	25
C. Altura .....	25
D. Características del tallo.....	25
E. Características de la hoja.....	26
F. Características de la flor.....	26
G. Características del fruto.....	27
H. Características de la semilla .....	27
3.2.4 Requerimientos climáticos y edáficos del cultivo.....	27
3.2.5 Requerimientos nutricionales .....	28
3.2.6 Tipos de patrones.....	29
3.2.7 Propagación .....	29
A. Injerto.....	29

B. Variedades.....	30
3.2.8 Enfermedades.....	30
3.2.9 Situación actual de la comercialización y precios en el mercado.....	31
3.2.10 Zonas potenciales de producción en Guatemala.....	32
3.2.11 Rendimiento del cultivo.....	32
3.2.12 Antecedentes de micropropagación en <i>Diospyros kaki</i> .....	33
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 GENERAL.....	35
4.2 ESPECÍFICOS.....	35
5. HIPÓTESIS.....	36
6. METODOLOGÍA.....	37
6.1 FASES DE LA INVESTIGACIÓN.....	37
6.1.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre.....	37
6.1.2 Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.....	38
A. Tratamientos.....	38
B. Unidad experimental.....	38
C. Variables de respuesta.....	39
D. Análisis de la información.....	39
E. Presentación de resultados.....	39
6.1.3 Fase II: Control de oscurecimiento oxidativo y muerte del explante.....	39
A. Tratamientos.....	40
B. Unidad experimental.....	43
C. Variables de respuesta.....	43
D. Análisis de la información.....	43
E. Presentación de resultados.....	43
6.1.4 Fase III: Inducción y crecimiento de brotes y callo.....	43
A. Tratamientos.....	44
B. Unidad experimental.....	44
C. Variables de respuesta.....	44
D. Análisis de la información.....	45
E. Presentación de resultados.....	45
6.1.5 Fase IV: Enraizamiento.....	45
A. Tratamientos.....	46
B. Unidad experimental.....	47
C. Variables de respuesta.....	47
D. Análisis de la información.....	47
E. Presentación de resultados.....	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
7.1 fases de la investigación.....	48
7.1.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre.....	48
7.1.2 Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.....	48
7.1.3 Fase II: Control de oscurecimiento oxidativo y muerte del explante.....	50
7.1.4 Fase III: Inducción y crecimiento de brotes y callo.....	55
A. Formación de callo.....	55
B. Crecimiento de brotes.....	57
7.1.5 Fase IV: Enraizamiento.....	62
8. CONCLUSIONES.....	65
9. RECOMENDACIONES.....	66
10. BIBLIOGRAFÍA.....	67
11. APÉNDICE.....	70

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1: Requerimientos nutricionales del cultivo de persimón, para una densidad de 400 árboles/ha con una edad promedio de 7 años. ....	28
Cuadro 2: Rango óptimo de elementos en los análisis foliares en cultivo de persimón.....	28
Cuadro 3: Principales enfermedades fungosas que atacan al cultivo de persimón, AGEXPRONT (1) e Infoagro (23).....	31
Cuadro 4: Zonas potenciales de producción de persimón en Guatemala. ....	32
Cuadro 5: Concentraciones de antioxidantes como ácido cítrico y L-cisteina evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).....	40
Cuadro 6: Concentraciones de absorbentes como Carbón activado y Polivinylypyrrolidone evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).....	40
Cuadro 7: Evaluación de medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), para obtener un medio líquido y para limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo) con el medio nutritivo, utilizando puentes de papel filtro. ....	41
Cuadro 8: Diferentes concentraciones del medio básico M&S y dos dosis diferentes de PVP. Utilizando como explantes yemas con 1 cm de tallo. ....	41
Cuadro 9: Diferentes concentraciones de Bencilaminopurina evaluadas para la inducción y crecimiento de brotes. ....	44
Cuadro 10: Escala de medición de las diferentes categorías utilizadas en la medición de tamaño de callos producidos por explante (ápice). ....	45
Cuadro 11: Escala de medición de las diferentes categorías utilizadas en la medición de tamaño de brotes producidos por explante (ápice). ....	45
Cuadro 12: Diferentes concentraciones de ácido indolbutíico (IBA) y ácido indolacético (AIA) evaluados para la inducción de raíces. ....	46
Cuadro 13: Resultados obtenidos en el control de la oxidación de explantes, 3 días después de la siembra, utilizando antioxidantes como ácido cítrico y L-cisteina (yemas con un centímetro de tallo). ....	50
Cuadro 14: Resultados obtenidos en el control de la oxidación de explantes, 8 y 15 días después de la siembra, utilizando absorbentes como Carbón activado y polivinylypyrrolidone evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).....	51
Cuadro 15: Resultados obtenidos a los 8 y 15 días después de la siembra en el medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), para obtener un medio líquido y para limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo) con el medio nutritivo, utilizando puentes de papel filtro. ....	52
Cuadro 16: Resultados obtenidos a los 21 y 30 días después de la siembra en el medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), en medio líquido, con puente de papel filtro y así, limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo), con el medio nutritivo. ....	52
Cuadro 17: Diferentes concentraciones del medio básico y dos dosis diferentes de PVP. Utilizando como explantes yemas con 1 cm de tallo. Resultados recabados 30 días después de la siembra e incubación. ....	53
Cuadro 18: Resultados de formación de callo en persimón var. Hachiya, a los 30 días de incubación. En el medio "M&S básico modificado", 300 ppm de PVP como absorbente para contrarrestar la oxidación y 0.1 ppm de ácido giberélico, así como sus respectivas concentraciones de BAP evaluadas.....	56
Cuadro 19: Resultados obtenidos 30 días después de la incubación de ápices en el cuarto de crecimiento. Anotándose el % de explantes vivos; % de contaminación por hongos y/o bacterias; Tamaño promedio del explante; Calidad de brote y número de brotes en promedio. ....	58
Cuadro 20: Comportamiento de resultados obtenidos a los 30 días en la inducción de raíces, evaluado cinco dosis de AIA y cinco de IBA. ....	63
Cuadro 21A: Proporción de nutrientes utilizados en el Medio básico de Murashige y Skoog (1962).....	70
Cuadro 22A: Medio "M&S básico modificado", basado en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2) y cálculos descritos en Cuadro 23A. ....	70
Cuadro 23A: Cálculos efectuados para determinar los gramos de compuestos requeridos para un litro de medio "M&S básico modificado", así como los gramos requeridos en la solución patrón de dicho medio. ....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1: Interacción entre auxinas y citocininas, adaptado de Curso de cultivo de tejidos (11). .....	21
Figura 2: Árbol y fruto de persimón Var. Hachiya.....	37
Figura 3: Procedimientos utilizados en la desinfestación, para observar el daño causado a los explantes por las diferentes concentraciones diluidas de cloro y determinar la concentración más viable. ....	38
Figura 4: Yemas de Persimón var. Hachiya en sus diferentes fases de desarrollo.....	39
Figura 5: Efecto del tiempo de exposición de explantes de persimón a una solución de fungicida, bactericida y antioxidante.....	49
Figura 6: Efecto de la exposición de los explantes por 5 minutos a las diferentes concentraciones de la solución de hipoclorito de sodio. ....	49
Figura 7: Comparación de diferentes concentraciones del medio M&S y M&S básico modificado, elaborado de acuerdo al rango óptimo de elementos en análisis foliar, y la respuesta de dos tipos de explantes a 30 días después de incubados). ....	54
Figura 8: Resultado de los tratamientos T1, T2, T4, T5, y T6 (cuadro 18), a la inducción de brotes y callo. ....	57
Figura 9: Comportamiento de sobrevivencia de explantes a los 30 días, evaluando 6 concentraciones diferentes del regulador 6-bencilaminopurina y su interacción con 0.1 ppm de AG <sub>3</sub> .....	59
Figura 10: Comparación de 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm y 10 ppm de BAP y 0.1 ppm de AG <sub>3</sub> en la inducción de crecimiento de explantes. ....	59
Figura 11: Respuesta a las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina en la inducción y crecimiento de brotes. ....	60
Figura 12: Explantes cultivados en el medio "M&S básico modificado" en base a rango óptimo de nutrientes requeridos por el cultivo de persimón, complementado con 0.1 ppm de AG <sub>3</sub> y 6 ppm de BAP con un promedio de 70 días de cultivo. ....	62
Figura 13: Porcentajes de enraizamiento, ennegrecimiento y oxidación en explantes de persimón ante la presencia de la auxinas ácido indolacético. ....	64
Figura 14: Porcentajes de enraizamiento, ennegrecimiento y oxidación en explantes de persimón ante la presencia de la auxinas ácido indolbutírico. ....	64
Figura 15A: Comparación de concentraciones en ppm de macronutrientes de elementos que constituyen el medio de cultivo "M&S básico modificado", y el rango máximo, mínimo y medio, basados en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2). ....	72
Figura 16A: Comparación de concentraciones en ppm de micronutrientes de elementos que constituyen el medio de cultivo "M&S básico modificado", y el rango máximo, mínimo y medio, basados en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2). ....	72

## **RESPUESTA DEL PERSIMOM *Diospyros kaki* L. VAR. HACHIYA AL CULTIVO DE TEJIDOS *In Vitro***

### **ANSWER OF THE PERSIMOM *Diospyros kaki* L. VAR. HACHIYA TO *In Vitro* TISSUES CULTURE**

#### **RESUMEN**

En Guatemala existe una diversidad de áreas geográficas cuyas condiciones ecológicas y características agrícolas son favorables para el establecimiento del cultivo de Persimón *Diospyros kaki* L. variedad Hachiya, teniendo como áreas posibles de explotación a Quetzaltenango, San Marcos, Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Totonicapán, Sacatepéquez, Solola, Chimaltenango y Guatemala. De acuerdo con la AGEXPRONT, quien a evaluado detenidamente las alternativas favorables de fomentar dicho cultivo en Guatemala, como parte integral de un adecuado proceso de diversificación agrícola, ha estimado que el cultivo de Persimón es técnicamente viable y económicamente rentable (con una relación de beneficio costo de 1.44% en los primeros 7 años).

La variedad Hachiya es un árbol que presenta frutos sin semilla, y las formas tradicionales de propagación son por medio de injerto. Murayama, *et al.*, (1989) y Tetsumura, *et al.*, (1991), investigaron la respuesta a la micropropagación de numerosas variedades de Persimón. Tomando en cuenta los resultados obtenidos, la micropropagación de ésta variedad da una nueva alternativa para la propagación masiva y acelerada a mediano y largo plazo, sin embargo no se reportan investigaciones sobre la variedad Hachiya.

Con el objetivo de establecer una respuesta favorable a la micropropagación en cultivo *in vitro* del Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya, se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, una investigación desarrollada en las siguientes fases; En donde la fase O, consistió en seleccionar la planta de la cual se obtendría el material vegetal, tomando en cuenta aspectos como la edad del árbol, rendimiento, tamaño y color del fruto, así como la tolerancia a enfermedades; En la fase I, se estableció el cultivo en condiciones de asepsia, determinándose un periodo de exposición máximo de 3 horas de sumergimiento de los explantes a una solución de desinfectante (Fungicidas a 0.1% Bactericidas 0.15% y antioxidantes 0.4%), así como la concentración de hipoclorito de sodio del 0.30% no encontrando así daños por intoxicación en el material vegetal; La fase II, en esta fase se realizó la modificación del medio básico Murashige y Skoog al medio "M&S básico modificado", encontrándose al mismo tiempo que el absorbente Polivinylypyrrolidone en concentración de 300 ppm controló la liberación de compuestos fenólicos, evitando así la oxidación y necrosis del explante; En la fase III, se determinó que a 6 ppm de 6-bencilaminopurina indujo un mayor crecimiento de brotes; En la fase IV, se evaluaron las auxinas ácido indolacético y ácido indolbutírico en un rango de 0.25 a 2 ppm, no obteniendo así respuesta alguna a la inducción de raíces.

## 1. INTRODUCCIÓN

El fitomejoramiento en la búsqueda de alternativas de producción es un factor determinante para tener éxito en la producción y comercialización de productos de calidad. Además, se deben tener alternativas para diversificar los productos existentes en el mercado. Esto se logra aprovechando el máximo potencial genético de las especies, sin embargo, en el caso del Persimón *Diospyros kaki* L. variedad Hachiya existe un inconveniente en cuanto a su propagación, ya que hasta el momento puede reproducirse únicamente por injerto o acodo, considerando que para poder realizar el injerto de la variedad Hachiya, el porta injerto proveniente de semilla botánica, debe tener la edad de dos a dos años y medio, que es el tiempo en el cual el patrón adquiere el grosor ideal para injertar.

El Persimón es un cultivo deciduo originario de China y Japón que se introdujo a Guatemala, en Alta Verapaz en 1925 y en Antigua Guatemala en 1930, además, en la actualidad se han reportado experiencias relevantes en cuanto a la producción comercial del Persimón en plantaciones ubicadas en San Cristóbal Alta Verapaz y Magdalena Milpas Altas Sacatepéquez.

Las variedades sin semilla como en el caso de Hachiya, tienen un mesocarpio carnoso de color amarillo dorado-anaranjado, con un sabor dulce, los frutos son de tamaño grande y uniformes. Estas características hacen que sea una de las variedades más cultivadas, además, de su magnífica calidad, es resistente al transporte y a los ataques de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*).

En las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de San Carlos de Guatemala se realizó el proyecto de investigación que establece la respuesta a la micropropagación en cultivo *in vitro* del Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya, para ello el trabajo se subdividió en cinco fases: En donde la fase 0, consistió en seleccionar la planta de la cual se obtendría el material vegetal, tomando en cuenta aspectos como la edad del árbol, rendimiento, tamaño y color del fruto, así como la tolerancia a enfermedades; En la fase I, se estableció el cultivo en condiciones de asepsia, determinándose la concentración de hipoclorito de sodio que no provoca daños por intoxicación en el material vegetal; La fase II, consistió en establecer la concentración de antioxidante y/o absorbente que controle la liberación de compuestos fenólicos, evitando la oxidación y necrosis del explante; En la fase III, se evaluó la 6-bencilaminopurina en un rango de 0.2 a 10 ppm, para establecer la concentración que indujo un mayor crecimiento de brotes; En la fase IV, se evaluaron las auxinas ácido indolacético y ácido indolbutírico en un rango de 0.25 a 2 ppm, las cuales indujeran la formación y crecimiento de raíces en brotes cultivados en el mejor medio de la fase III.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En Guatemala existe diversidad de áreas geográficas cuyas condiciones agroecológicas son favorables para el establecimiento del cultivo de Persimón *Diospyros kaki* L. variedad Hachiya, ya que éste cultivo puede desarrollar potencial genético en dichas áreas y por ende contribuir a la diversificación de cultivos e incrementar la producción de productos no tradicionales, los cuales generarán incremento de divisas para el país, contribuyendo al desarrollo de las comunidades.

De acuerdo con la AGEXPRONT, quien ha evaluado detenidamente las alternativas favorables de fomentar dicho cultivo en Guatemala, como parte integral de el adecuado proceso de diversificación agrícola, ha estimado que el cultivo de Persimón es técnicamente viable y económicamente rentable (con una relación de beneficio costo de 1.44% en los primeros 7 años). Y teniendo como áreas posibles de explotación: Quetzaltenango, San Marcos, Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Totonicapán, Sacatepéquez, Solola, Chimaltenango y Guatemala. Sin embargo, éste cultivo no se ha difundido en estas áreas, debido al desconocimiento del mismo, así como el limitado y largo periodo que requiere para la propagación. Siendo la variedad Hachiya un árbol que presenta frutos sin semilla, las formas tradicionales de propagación son por medio de injerto.

En el caso de realizarse por injerto, se utiliza como patrón la variedad Lotus, pero para realizar el injerto la variedad antes mencionada debe tener la edad de dos a dos años y medio, desde la recolección del fruto hasta la época de realizar el injerto. Periodo en el cual los costos de mantenimiento de los semilleros resultan poco atractivos.

Murayama, *et al.*, (30), en 1989 investigaron la respuesta del Persimón var. Hiratanenashi ante la propagación *in vitro*, utilizando diferentes medios de cultivo, complementado con la citocinina 6-bencilaminopurina BAP, obteniendo resultados satisfactorios con el medio M&S con la mitad de su concentración de sales, y BAP a razón de 5 mg/L para la inducción de brotes. Trabajos posteriores realizados por Tetsumura, *et al.*, (40), en 1991 también indican haber tenido resultados satisfactorios con las variedades Hazegoshō, Hiratanenashi, Jiro, Kakiyamagaki, Kurogaki, Metogaki, Mushirodagoshō y Nagara, utilizando BAP a razón de 5 ppm en la inducción de brotes.

Sin embargo, no se reporta ningún trabajo de micropropagación para la variedad Hachiya, y tomando en cuenta los resultados obtenidos por los investigadores anteriormente mencionados, la micropropagación de ésta variedad da una nueva alternativa para la propagación masiva y acelerada a mediano y largo plazo. Además de seleccionar progenitores con características fenotípicas deseables para nuestras condiciones agroclimáticas y edáficas, los cuales podrán ser clonados, obteniéndose plantaciones con características homogéneas.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1 Micropropagación.

Vásquez, *et al.*, (43), concuerdan en que el término micropropagación, está ampliamente difundido actualmente, y en vista de que el cultivo de tejidos *in vitro*, se inicia con muy pequeñas fracciones de plantas y posteriormente se manejan pequeños brotes, esto implica que necesita un pequeño espacio para mantener y multiplicar un gran número de plantas. Según Glosario multilingüe... (19), de todo cultivo celular que se ha iniciado con una sola célula o un individuo, al producto de plantas obtenidas se le llama Clon<sup>1</sup> y se espera que las plantas obtenidas sean copias genéticamente similares a la célula inicial y es, a este proceso al que se le conoce como propagación clonal. Esta técnica ha resultado ser útil para obtener un gran número, ya sea de células o de organismos con idénticas características genéticas, que provienen de un individuo directamente o que ésta se obtenga en combinación con técnicas de ingeniería genética.

De acuerdo con los OIRSA (31), actualmente la micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de tejidos o células cultivadas en forma aséptica, en un recipiente en el que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición. La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo y las suspensiones celulares, así como varios órganos de plantas tales como tallos, flores, raíces y embriones de crecimiento de manera más o menos indefinida, se han utilizado durante varias décadas en los laboratorios científicos como unos instrumentos de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos. A estos métodos se les ha llamado también colectivamente cultivo de tejidos, una expresión que en ocasiones se utiliza como sinónimo de micropropagación.

Azpeitia, *et al.*, (5), mencionan que la multiplicación del durazno se realiza por semilla, acodado aéreo e injertado. Sin embargo, la tendencia a la micropropagación *in vitro*, presenta ventajas potenciales respecto a las anteriores, ya que a parte de utilizarse en la producción de farmacéuticos y obtención de otros productos naturales, también es aplicable al mejoramiento genético de cultivos de árboles frutales.

Arena y Pastur (4), manifiestan que dentro de las innumerables ventajas que posee la micropropagación en relación a la propagación convencional se encuentra el reducido espacio que se necesita para producir un importante número de plantas a partir de un explante. Por ejemplo: a partir de una yema de "parrilla" al cabo de seis meses se pueden obtener de 800 a 1000 plantas enraizadas sin importar la época del año, pudiendo efectuar así la introducción rápida de esta especie. La producción de plantas de sanidad controlada, la propagación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales y la posibilidad de conservar por un largo tiempo germoplasma importante ó en vías de extinción son otras de las ventajas que ofrece el cultivo *in vitro*.

---

<sup>1</sup> Según Glosario Multilingüe sobre Recursos Genéticos Forestales (19), definen a un Clon como un grupo de plantas derivadas asexualmente de un solo individuo y por consecuencia de constitución genética idéntica.

### 3.1.2 Cultivo de tejidos

Doods y Roberts (12), indican que el cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en un medio que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo. Además, parte de la premisa “Toda célula de un organismo multicelular es capaz de desarrollarse si se le dan las condiciones externas apropiadas. La célula tiene la habilidad de desarrollarse, regenerando un organismo entero”. Y la nueva planta será genéticamente idéntica a la planta madre y el desarrollo de esta será en un periodo corto. Por su lado Calderón (9), indica que el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos métodos biotecnológicos y ofrecen la oportunidad de reducir el tiempo requerido para la producción de variedades mejoradas, a partir de un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplastos, células, tejidos y órgano), el cual se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida, el cual se incuba en condiciones ambientales controladas.

En la mayoría de los cultivos de importancia económica, Calderón (9), manifiestan que se necesita de 7 a 10 años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras que en el cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de reducir el tiempo y volumen de siembra en campo requerido por los métodos convencionales.

El establecimiento del cultivo de tejidos, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, lo que a su vez dependerá del objetivo perseguido,

### 3.1.3 Establecimiento de cultivo *in vitro*

FAO (15), menciona que para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se llevan a cabo en un ambiente estéril.

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta, sin embargo, la fuente inicial del material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos según FAO (15), Este autor menciona que es recomendable comparar varias fuentes de células, tejidos u órganos antes de decidirse por alguno de ellos. Comúnmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito en el cultivo de tejidos u órganos disminuye con el aumento de la edad de la planta, por lo que es recomendable utilizar plantas jóvenes como fuente de explantes.

#### A. Reacciones de hipersensibilidad en las plantas cultivadas *in vitro*

Encinas (13), manifiesta que la elección, aislamiento y desinfección del explante es el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal, y el éxito de esta fase depende en gran medida de toda una serie de parámetros relacionados con el propágulo (estado fisiológico, edad, estado de desarrollo, estado

fitosanitario) y con el sistema seguido para su manipulación y esterilización, incluso trabajando en condiciones óptimas y muy poco agresivas los tejidos que forman el explante sufren siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés y desecación, daños mecánicos, daños en la desinfección, cambios de pH, cambios en el potencial hídrico, salino y osmótica al ser incubado en el medio de cultivo, todo esto provoca la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos. Estas sustancias van a provocar o conducir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio el contenido de las células deterioradas, reacciones de estrés en las células vecinas de las dañadas, incluso aunque esas células no parezcan estar dañadas, y/o una muerte prematura de células específicas de esa zona o del lugar de la infección.

Sierra, *et al.*, (36), indican que frecuentemente el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos, procedentes de plantas leñosas se ve impedido por la aparición de ennegrecimiento y necrosis de los tejidos. Puesto que al cortar, se exudan compuestos fenólicos de los tejidos de las plantas que luego se oxidan ennegreciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los mismos.

En respuesta al estrés o daño mecánico, Encinas (13), menciona que en general el metabolismo fenólico presenta tres tipos de reacciones:

- a) La síntesis de productos fenólicos monoméricos (fitoalexinas).
- b) La síntesis de derivados polifenólicos.
- c) La oxidación de componentes fenólicos preformados, que van a dar lugar quinonas y a material polimerizado (ligninas).

La síntesis de monofenoles puede conducir a la acumulación en tejidos no dañados de grandes cantidades de productos ya preformados, o dar lugar a la aparición de nuevos productos, las fitoalexinas, cuyo papel en los mecanismos de protección contra enfermedades es bien conocido. Así, una acumulación de material polimerizado, tipo lignina, va a actuar como una barrera física contra las invasiones microbianas, y las quinonas y fitoalexinas van a actuar inhibiendo el crecimiento microbiano, tras la infección por los patógenos.

Un grupo especial de fenoles son aquellos que protegen las auxinas (tienen un efecto antioxidante inhibiendo la oxidación del ácido indolacético (AIA). En una planta completa existe un gradiente de inhibición de la degradación enzimática del AIA, que es inversamente proporcional a la edad del tejido, por ello la inhibición disminuye del ápice a la base del tallo (Stonier, Eds., Colloques internationaux CNRS nº 193. Les cultures de tissus de plantes, Paris 1971), citado por Encinas (13).

De acuerdo con Encinas (13), en general los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar, y los productos de esta oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar procesos morfogénicos y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, ya que tras su propia oxidación se convierten en potentes oxidantes.

En general, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar por una parte, los compuestos fenólicos protectores de auxinas, con el objeto de estimular el crecimiento tisular y, por otro frente limitar la biosíntesis de fenoles y/o retardar o impedir su oxidación cuando llegan al medio de cultivo. Esta oxidación de fenoles provoca en los cultivos el "browning" o "Blackening" es decir, un ennegrecimiento tanto del medio de cultivo como de

explante, que suele concluir con la muerte o necrosis generalizada de los propágulos (George y Sherrington, Eds., *Plant propagation by tissue culture*. Basingstoke. 1984), citado por Encinas (13).

Se han propuesto diversos métodos para eliminar o reducir los efectos negativos de estos compuestos fenólicos. Para empezar es lógico suponer que evitar o suavizar el estrés que provocan o estimulan su biosíntesis, será el mejor método para impedir que estas sustancias aparezcan en los cultivos y produzcan efectos tóxicos e inhibición del crecimiento. Una práctica adecuada sería cuidar que las condiciones fitosanitarias y fisiológicas de las plantas madres y el origen de los explantes fueran idóneas en la Fase 0, y que los métodos de desinfección y aislamiento fueran lo menos agresivos posibles en la Fase 1 de establecimiento de los cultivos. Otros métodos que dan buen resultado si la síntesis de fenoles no puede evitarse son: la dispersión, adsorción o lavado, con sustancias como el carbón activado (CA) o la polivinylpyrrolidone (PVP); la modificación del potencial redox (disminuyendo los agentes redox, o la disponibilidad de oxígeno; la inactivación de enzimas de tipo fenolasa (quelantes), y otros sistemas como la incubación en condiciones de oscuridad, bajo pH, incubación a temperaturas más bajas que persiguen reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos. La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que tras su oxidación pasan a ser oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles (Cleland, *Biochem. 3*: 480, 1964), citado por Encinas (13). Otro método utilizado es el subcultivo frecuente en un medio fresco, así como la inmersión en agua destilada por algunas horas antes de la siembra *in vitro*, Sierra, *et al.*, (36).

George (18), recomienda para disminuir el ennegrecimiento de los explantes, realizar un proceso de dispersión o lixiviación de los compuestos fenólicos, debiéndose realizar los cortes dentro de un medio líquido, esto con el propósito de eliminar los productos relacionados con las células dañadas. También recomienda realizar enjuagues o dejar en agua estéril durante 2 o 3 horas antes de transferir al medio de cultivo. El mismo autor recomienda realizar transferencias frecuentes a medios nuevos y frescos, así como realizar cortes de las partes obscurecidas de los explantes. Otra alternativa descrita por el mismo autor, es la utilización de medios líquidos, utilizando puentes de papel filtro o reduciendo la concentración de los agentes gelificantes.

Encinas (13), manifiesta que determinados componentes de la formulación del medio de cultivo como las citoquininas y micronutrientes:  $Mn^{++}$  y  $Cu^{++}$  (componentes de complejos enzimáticos) e incluso el potencial osmótico del medio pueden potenciar o inhibir la biosíntesis de compuestos fenólicos, su difusión y oxidación, interfiriendo activamente las reacciones de hipersensibilidad vegetal (ennegrecimiento, inhibición del crecimiento, necrosis) que provocan en condiciones *in vitro*.

George (18), hace referencia a que otra alternativa para reducir el ennegrecimiento de los cultivos, es la reducción de componentes del medio tales como el nitrógeno y potasio entre otros ya que no todos los cultivos son tolerantes a altas concentraciones de estos nutrientes.

#### **3.1.4 Tipos de cultivo *in vitro***

Según Curso de cultivo de tejidos (11), manifiestan que los explantes pueden ser de muy diversas clases. Y la adecuada escogencia del material que sirve de explante, así como la parte o estructura de la planta que se pone en cultivo, ha permitido distinguir los siguientes tipos de cultivos asépticos

### **A. Órganos con crecimiento determinado (hojas, flores y frutos)**

Curso de cultivo de tejidos (11), indica que éstos presentan un tamaño y crecimiento definido. Por ello resulta de un potencial restringido de división y diferenciación, el cual es impuesto por las células que forman el primordio meristemático inicial del órgano, en una etapa muy temprana de su desarrollo.

Al cultivar este tipo de órganos, lo que se realiza generalmente es su desarrollo en condiciones asépticas. Ello permite el estudio del crecimiento de estos órganos separados de la planta, no así la propagación de los mismos. Pero si inducimos una fase de crecimiento desorganizado (callo), perdiendo la estructura original, y estimular la organogénesis podemos regenerar y multiplicar la planta, Curso de cultivo de tejidos (11).

### **B. Órganos con crecimiento indeterminado (ápices de tallo y de raíz)**

#### **a. Cultivo de raíces aisladas**

Puede establecerse a partir de raíces laterales o primarias, las cuales pueden ser obtenidas a partir de plántulas germinadas en condiciones asépticas o bien en raíces de plantas en cultivos hidropónicos o en el campo, Curso de cultivo de tejidos (11).

Las raíces colocadas en un medio de cultivo adecuado, producen un sistema radical consistente de raíces primarias y secundarias, y como regla general, las raíces no forman yemas de tallo, Curso de cultivo de tejidos (11).

En ciertas especies, después de varios subcultivos, las raíces pueden cesar completamente su crecimiento y la transferencia a un medio fresco tampoco lo estimula. En algunos casos el cultivo puede reanudarse si se extraen de él los meristemos laterales recientemente formados y se colocan sobre un nuevo medio, Curso de cultivo de tejidos (11).

#### **b. Cultivo de meristemos y ápices del tallo**

Al igual que las puntas de raíz, los ápices del tallo pueden crecer en forma indefinida y organizada. En los primeros estadios del desarrollo embrionario vegetal, la división celular tiene lugar en todo el organismo, pero a medida que el embrión se desarrolla y se transforma en una planta adulta la adición de nuevas células se restringe a ciertas partes de la misma, mientras que el resto de la planta se especializa en otras actividades específicas. Estos grupos de células que retienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta se denominan meristemos, (Esau, 1976), citado por Hurtado y Merino (22).

Según, Rincondelvago (32), las plantas nunca dejan de crecer, ya que podemos arrancar una rama de un árbol de 200 años y plantarla, de forma que observaremos como esta rama se comportará como si fuera una nueva planta y podrán crecer muchos años mas. Esto nos lleva a considerar que los tejidos de los vegetales se están formando indefinidamente, de forma que debe existir una porción de la planta especializada para dar los tejidos adultos. Ha ésta parte de la planta se le ha llamado meristemo.

Los meristemos incluyen meristemos de raíz, de tallo (principales y laterales) e intercalares, así como también el engrosamiento de meristemos primarios y meristemos secundarios, como lo son el felógeno y el

cambium. El meristemo apical de tallo da lugar a diversos tipos de células, tejidos y órganos, Wolff (1759), citado por Hurtado y Merino (22). Esau (1976), citado por Hurtado y Merino (22), reconoció que esta región indiferenciada denominada meristemo daba origen al crecimiento de la planta.

Curso de cultivo de tejidos (11), Hernández (21) y Usui, *et al.*, (42), concuerdan en que el aspecto más importante es que los ápices pueden regenerar pequeños tallos, los cuales pueden ser luego enraizados. Este tipo de cultivo tiene una repercusión importante en la propagación vegetal. Esto se debe a que permite obtener plantas genéticamente idénticas a la planta de la cual se originan, además, el cultivo de pequeñas porciones de ápices del tallo (0.2-1.0 mm. el meristemo y dos o tres primordios foliares) constituye una técnica para obtener plantas libres de virus. Esta técnica conocida como cultivo de ápices, a sido mal llamada cultivo de meristemas. Sin embargo, el cultivo de ápices o de yemas axilares (5-10 mm.) es utilizado como un medio exitoso de propagación de plantas, puesto que estos regeneran un tallo que pueden ser luego inducidos a formar raíces o bien vuelto a cultivar para inducir la brotación de las yemas axilares para formar más tallos, los cuales podrán a su vez ser enraizados.

Curso de cultivo de tejidos (11), manifiesta que el uso de los terminas “meristemo” y “ápices”, debe estar condicionado al tamaño del inoculo y al tipo de tejido contenido en él. Anatómicamente el “meristemo” consistente del domo (células no diferenciadas de carácter embrional), y con dimensiones no mayores de 0.1 mm de longitud. Los “ápices meristemáticos” se refiere entonces al domo, con uno o varios primordios foliares y de tamaño variable.

Hernández (21), indica que la micropropagación por brotes axilares puede hacerse utilizando ápices del tallo o nudos con una o varias yemas axilares. Los ápices que se usan generalmente son de dos centímetros de largo y los nudos pueden ser de ápices terminales o laterales, con parte del tallo incorporado. Los explantes de mayor tamaño son fáciles de manipular y tienen mayores posibilidades de sobrevivencia, pero también resulta más difícil su descontaminación por el tamaño del explante.

La ventaja de éste método de propagación, es la estabilidad genética que muestran los individuos regenerados ya que estos provienen de una multiplicación clonal, en la cual, la naturaleza de las células meristemáticas es diplóide, (Murashige, 1974), citado por Hurtado y Merino (22).

Hurtado y Merino (22), indican que muchos cultivos comerciales vegetales, particularmente los que son propagados vegetativamente, contienen virus sistémicos, los cuales afectan su funcionamiento o abaten su rendimiento. Por tanto, antes de liberarse comercialmente es deseable producir plantas libres de virus, que pueden ser clonalmente multiplicadas. En muchas especies, lo anterior puede lograrse con tratamientos con calor de varios órganos *in Vitro*, o de plantas compuestas, así como con la aplicación de productos químicos. Sin embargo, ciertos virus han resistido todas las pruebas de erradicación por estos medios y se hacen necesarios otros métodos.

Actualmente la alternativa de más éxito es el cultivo de meristemas apicales Hurtado y Merino (22), ya que frecuentemente son combinados con quimioterapia o con tratamientos con calor. Cuando estos métodos son usados, las plantas no sólo son liberadas de virus, sino también de hongos y otros patógenos.

Mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, podemos estudiar diferentes fenómenos morfogénéticos que nos ayuden a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de partes aisladas de la planta, que están fuera de las influencias correlativas del resto de la misma. Se pueden cultivar varios tipos de tejidos, como protoplastos, callos, nucelas, óvulos, primordios florales y meristemos apicales y laterales. De estos tejidos, los meristemos apicales han sido los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas en una amplia gama de cultivos económicamente importantes (Quak, 1977; Walkey, 1978), citado por Hurtado y Merino (22).

Hurtado y Merino (22), aclaran que el estudio detallado *in vitro* de los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales nos ayuda a entender los mecanismos reguladores que controlan la diferenciación de las plantas. De aquí la gran importancia de los meristemos de la planta, pues se encuentran asociados con células altamente diferenciadas, además de que el meristemo da origen a diversos tipos de células, tejidos y órganos para formar a una planta completa; también se perpetúa así mismo, produciendo células que retienen su actividad meristemática.

Ball, (1960), citado por Hurtado y Merino (22), probó el cultivo de meristemos apicales de *Lupinus olbus* L. en un medio que contenía aminoácidos, leche de coco, ácido giberélico y vitaminas, observando sólo una pequeña elongación del meristemo. Al repetir el experimento, dejó algunos primordios de hoja al meristemo y obtuvo plantas completas. Con base en estos resultados Ball concluyó que: i) el meristemo apical exhibe una dependencia hormonal y nutricional por el tallo subyacente y primordios de hoja, y ii) el meristemo apical de angiospermas sufre una diferenciación bioquímica que le impide producir ciertas sustancias esenciales para el crecimiento y mantenimiento de un meristemo determinado.

Smith y Murashige (1970), citado por Hurtado y Merino (22), indican que desarrollaron plantas completas a partir de meristemos apicales de *Nicotiana tabacum* L., *Daucus carota* L., *Nicotiana glauca* Grah., *Tropaeolum majus* y *Coleus blumei* Benth, en un medio que contenía sales inorgánicas de Murashige y Skoog, 100 mg de inositol, 0.4 mg/l de tiamina- HCl, 1 a 2 mg de IAA, 30 g de sacarosa y 1% de agar; se obtuvo el desarrollo de las hojas a los 12 días. Ellos demostraron que fueron innecesarias las estructuras subyacentes, pues se obtuvieron plántulas completas en un medio que sólo contenía IAA administrado de manera exógena. En un cultivo de meristemos apicales de *Coleus bluneii* los cuales incluían dos o más pares de primordios de hoja, Smith (1970), confirma las observaciones de Ball (1960), ambos citados por Hurtado y Merino (22), con respecto a que no se requerían sustancias de crecimiento exógenas si el inóculo incluía primordios foliares; si el primordio de hoja no estaba presente el abastecimiento de IAA era crítico; el ácido giberélico reprime la iniciación de hoja y raíces y la adenina parece repetir ligeramente la represión.

El balance adecuado de auxinas y citocininas *in vitro* de acuerdo con Hurtado y Merino (22), induce la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie en que estén actuando, lo cual implica que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz y que cuando maduran sintetizan citocininas que promueven la formación de brotes, ya sean primordios y hojas o yemas laterales (la principal fuente de citocininas son las raíces).

Cuando se aísla el meristemo apical no debe dañarse la región subdistal, (Wardlaw, 1965), citado por Hurtado y Merino (22), ya que se inicia la formación de yemas si la incisión es profunda y daña el tejido provascular; si el tejido provascular no es dañado se inicia la formación de hoja. Estas observaciones demostraron que los metabolitos necesarios para el crecimiento y desarrollo del meristemo apical pudieron ser transportados a través del parénquima de la médula y necesariamente a través del tejido pro-vascular (Wardlaw, 1945; 1949 y 1956), citado por Hurtado y Merino (22).

En cuanto a especies hortícolas y frutales se han realizado importantes investigaciones en relación con la obtención de material sano a partir de meristemos apicales; los más relevantes fueron hechos en papa (Sussex, 1965; Ingram y Robertson, 1965; Accatino, 1966; Gregorini y Lorenzi, 1964; Mellor y Stace-Smith, 1977; Wang, 1977 Solórzano, 1983), chile (Juo, Wahgy chien, 1973), fresa (Bdkengrcn y Muller, 1962), manzano (Elliott 1972; Jones, 1976; Abbot, 1976; Jones y Hopgood, 1979), vid (Barlass y Skene, 1978), etcétera. Todos citados por Hurtado y Merino (22).

### **C. Cultivo de embriones**

Curso de cultivo de tejidos (11), indica que los embriones de las semillas han sido utilizados como explantes para la iniciación de callo. En efecto los tejidos del embrión por su carácter juvenil son potencialmente meristemáticos. Inclusive, las células del callo que se logra formar a partir de embriones, forman en muchos casos, nuevos embriones que pueden generar un embrión, por lo que el número de plantas obtenido es muy elevado, a este proceso de formación de embriones a partir de células somáticas se le ha dado el nombre de "embriogénesis somática", y a los embriones obtenidos por esta vía el nombre de "embrioides" para diferenciarlos del embrión cigoto.

Usui, *et al.*, (42) y Curso de cultivo de tejidos (11), manifiestan que el embrión también puede ser aislado y puesto a germinar en un medio que permita su desarrollo hasta llegar a formar una planta. Este proceso es igualmente útil ya que permite la rápida producción de plántulas provenientes de semilla con baja viabilidad o con problemas de incompatibilidad. Sin embargo, si la planta proviene de granos de polen y no de embriones, las plantas que se obtiene son haploide. Es decir que únicamente contienen la mitad de la información genética.

Hernández (21), indica que otra de las aplicaciones del cultivo de embriones es el rescate de material de propagación en los frutales deciduos, cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad o donde ocurre aborto de embriones. También es útil para romper la dormancia en semillas, acortando el ciclo del cultivo o crecimiento en meses o incluso en años. Además, puede utilizarse cuando semillas importantes pierden su viabilidad durante el almacenamiento y presentan una pobre germinación.

### **D. Cultivo de células desorganizadas**

#### **a. Cultivo de células o suspensiones celulares**

Según el Curso de cultivo de tejidos (11), el cultivo de células o suspensiones celulares: tiene su origen a partir de callos friables (fáciles de desmoronar) que son colocados en un medio líquido y bajo agitación, las células individuales se dividen, llegando a formar cadenas y pequeños agregados celulares, que se vuelven a

romper originando nuevos grupos celulares, también pequeños. El material empleado puede ser cualquier parte de la planta. Debido a la presencia de las paredes celulares (que tienen tendencia a adherir las células una con otra) no ha sido posible obtener células individuales. El tamaño y proporción de los agregados celulares varía según la especie y el medio de cultivo.

El crecimiento en las suspensiones celulares de acuerdo con Curso de cultivo de tejidos (11), es más rápido que la del callo. Bajo el punto de vista de la micropropagación, las suspensiones celulares podrían proveer una multiplicación extremadamente rápida por medio de dos vías:

- Formación de embriones somáticos en la suspensión, los cuales son transferidos a condiciones que favorezcan su desarrollo en planta (medio sólido).
- Se toma una alícuota de la suspensión celular y se deposita sobre un medio sólido. Ahí las células se dividen y forman un callo, en el cual se induce la formación de órgano y luego a plantas, Curso de cultivo de tejidos (11).

#### **b. Cultivos originados a partir de una sola célula**

Se busca realizar clones a partir de un origen celular único. Se filtran las suspensiones celulares para eliminar todos los agregados de gran tamaño y permitir el paso de sólo células individuales y pequeños grupos celulares. En estos últimos se asume que por su cohesión se ha originado a partir de una célula única, IICA (11).

La suspensión obtenida es entonces repartida sobre un plato de petri conteniendo una fina película de medio sólido. La densidad de inóculo debe ser suficiente para permitir el crecimiento de las células. Esta forma callos cuyo origen es una única célula. Estas son separadas y transferidas a un medio fresco. De ésta forma se obtienen líneas o razas celulares, Curso de cultivo de tejidos (11).

Según Curso de cultivo de tejidos (11), los cultivos celulares permiten la obtención de líneas genéticamente diferentes, posibilitando la selección de líneas que presenten (después de análisis) una característica deseable como tolerancia a altos niveles de sales, producción de metabolito determinado, resistencia a un patógeno (este último a sido realizado con éxito en caña de azúcar).

#### **E. Cultivo de protoplastos**

El protoplasto según el Curso de cultivo de tejidos (11), es la parte viviente de la célula, compuesta por el citoplasma y el núcleo, al cual se le removió la pared celular. En el cual para realizar un aislamiento exitoso ha sido necesaria la contracción del protoplasto para separarlo de la pared celular. Es decir, una plasmolisis parcial. Esto se realiza con soluciones de sales como KCl o MgSO<sub>4</sub>, o bien con azúcares como maniotosa. Estas sustancias permiten que el protoplasto se “encoja” suficiente sin causarle daño.

Según Curso de cultivo de tejidos (11), los protoplastos aislados son muy frágiles y muy sensibles a cualquier daño físico o químico. La capacidad de división de los protoplastos está ligada a su habilidad para formar una pared celular. Al formarse la pared celular, las células regeneradas se incrementan en tamaño y al cabo de 3 a 5 días se divide. Después de varias divisiones origina una pequeña colonia celular que luego

evoluciona a callo. Pero también se ha observado la regeneración de plantas a través de la formación de embriones originados de un protoplasto.

De acuerdo a Curso de cultivo de tejidos (11) y Hernández (21), la fusión de protoplastos se da mezclando dos especies o géneros antes de que se forme la pared. En este caso se forman células genéticamente híbridas (heterocarióticas), que normalmente solo pueden obtenerse por cruzamiento sexual. De esta manera es posible generar híbridos, pero de carácter somático. Ha ello se debe que esta técnica de cultivo de protoplastos abre las puertas a la ingeniería genética, permitiendo incorporar genes u otros orgánulos a una planta, incorporación de características de una bacteria a un vegetal superior, etc.

### 3.1.5 Explante

La selección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de nuestros cultivos; en primera instancia, dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que cultivados en condiciones apropiadas, permitan la proliferación de callos. Cualquier explante que contenga células nucleares vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos, Roca y Mroginski, citado por Calderón (9).

Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de los frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados, Roca y Mroginski, citado por Calderón (9).

Roca y Mroginski, citado por Calderón (9), manifiestan que la propagación *in vitro* de las plantas leñosas requiere la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles, ya que existe menos síntesis de fenoles.

Curso de cultivo de tejidos (11), menciona que aun cuando de otros tejidos se pueden obtener plantas sanas, los ápices tienen algunas ventajas a causa de su rápido crecimiento y su estabilidad genética.

#### A. Tamaño del explante

Torpe T., (1988), citado por Calderón (9), indica que el tamaño del explante es un aspecto que se debe de tomar en cuenta para el establecimiento de los cultivos, puesto que cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque esto trae como consecuencia mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante variable según el material, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables.

Dicho autor indica que también se deberá de tener en cuenta la incidencia de otros factores, que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores está la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o de campo. Otro factor sería los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos.

El tamaño del explante tiene que ver únicamente cuando se trata de obtener plantas libres de virus, pues los meristemos (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libre de estos patógenos, sin embargo, es más difícil regenerar de ello plantas completas, Villalobos (1982), citado por Calderón (9).

## **B. Asepsia del explante**

Calderón (9), cita a Roca y Mroginski. (sf.) Quienes señalan que las condiciones físicas y la asociación explante-medio en que normalmente se incuban los cultivos, conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos y competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las condiciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su anterior incubación y manipulación.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra, por lo que para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia, Roca y Mroginski, citado por Calderón (9).

Lizarra, *et al.*, (28), aseguran que el alcohol es un agente esterilizador común de la superficie, para eliminar bacterias y hongos, y es frecuentemente utilizado como un breve lavado antes de aplicar otros tratamientos de esterilización de la superficie de las plantas. Tiene una baja tensión superficial y puede penetrar fácilmente entre las pilosidades foliares y mojar la superficie de la planta. Además el etanol al 70% es más efectivo como agente esterilizador que el de 95-100%.

Lizarra, *et al.*, (28), menciona que soluciones acuosas de Hipoclorito de sodio (NaOCl) o de Hipoclorito de calcio (CaOCl) también pueden ser utilizadas para una esterilización superficial. La sal de calcio es preferida por que es menos fitotóxica. Muchos laboratorios utilizan lejía de uso doméstico tal como el Clorox. Estos productos comerciales contienen normalmente 5.25% NaOCl como producto activo. Cuando se le diluye con agua (1 parte de lejía: 9 partes de agua), la solución esterilizadora resultante deberá contener no menos de 0.5% de NaOCl.

Lizarra, *et al.*, (28), manifiesta que debido a la disociación completa, el hipoclorito tiene una actividad relativamente pequeña a un pH superior a 8.0 y es más efectivo fijando la solución a alrededor de un pH 6.0, además, el mismo autor indica que la superficie del tejido recientemente disectado y sumergido completamente en la solución de hipoclorito, queda esterilizada después de una exposición de 10-15 minutos. A continuación del tratamiento con hipoclorito, el material tratado debe ser lavado cuidadosamente con varios cambios de agua destilada, para eliminar completamente el desinfectante.

Según, Lizarra, *et al.*, (28), se deben utilizar los bactericidas y fungicidas en material que se encuentra fuertemente contaminado, algunos investigadores recomiendan el lavado en una mezcla bactericida y fungicida antes de proceder a la esterilización de la superficie. Sin embargo debe recordarse que éste tratamiento no tiene efecto sobre infecciones sistémicas.

ITESM (25), Indican que cuando se trabaja con explantes, una parte de ellos sufre daños por el hipoclorito de sodio, por ello estas partes se retiran y el explante queda listo para la inducción.

### 3.1.6 Medio de cultivo

El éxito del cultivo de tejidos de plantas está influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las secuencias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se obtienen cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales. Calderón (9) y Hernández (21).

Villalobos (1982), citado por Calderón (9) también indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes como lo son las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, molibdeno y cobalto. Un medio de cultivo contiene estos elementos y carbohidratos, normalmente sacarosa, este último compuesto sirve para reemplazar en un alto porcentaje el carbono que la planta normalmente fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos e inorgánicos en pequeñas cantidades tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.

La FAO (15), señala que en general los medios de cultivo, se encuentran constituidos por los siguientes componentes.

#### A. Sales inorgánicas

##### a. Macronutrientes

FAO (15), indica que los tejidos en cultivo requieren de una fuente de compuestos inorgánicos, además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio. Magnesio y Azufre.

**Nitrógeno:** FAO (15), manifiesta que el nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos iones.

Usui, *et al.*, (42), indican que el nitrógeno ( $\text{H}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ ), en concentraciones altas, promueve el enraizamiento. Mientras que en concentraciones bajas promueve desarrollo de callo.

De acuerdo con Fuchsiarana (16), el Nitrógeno participa en el crecimiento rápido y vigoroso; forma parte de la clorofila y es un componente necesario de los aminoácidos y, por tanto de las proteínas; también de los ácidos nucleicos y necesarios para la división y reproducción de las células; así mismo, es necesario para la formación de enzimas, que son proteínas especializadas promotoras de numerosas reacciones dentro de la planta. Por otro lado el exceso produce un crecimiento excesivo, hojas verdes oscuro y a menudo más carnosas y quebradizas, puede dar origen a bordes enrollados y clorosis diferentes, seguidas de puntos necróticos.

**Fósforo:** FAO (15), señala que este puede adicionarse en cualquiera de las formas  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

De acuerdo a Usui, *et al.*, (42), el Fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas. Principalmente es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía y dentro de los medios de cultivo, las plantas lo absorben en forma de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Fuchsiarana (16), agrega que juega un papel muy importante en la formación de raíces, además de estimular el crecimiento rápido de las plantas, por ello es necesario para la división celular.

**Potasio:** de acuerdo con FAO (15), es un catión que se agrega en forma de KCl,  $\text{KNO}_3$  ó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por otro lado Usui, *et al.* (42), indican que existe relación entre el potasio y la diferenciación de órganos.

Fuchsiarana (16), menciona que interviene en la traslocación de azúcares, en la actividad enzimática, además, equilibra las cargas eléctricas dentro de las células, por otro lado regula la presión de turgencia que contribuye a la apertura y cierre de los estomas.

**Calcio:** FAO (15), indican que se adiciona como  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ó la forma anhidra de cualquier sal.

Usui, *et al.*, (42), señala que el calcio es componente de la pared celular.

Fuchsiarana (16), indican que es esencial para el crecimiento de los extremos de tallos y raíces, además forma parte de las paredes celulares manteniendo su integridad y permeabilidad, dando resistencia estructural a la planta. La absorción de iones negativos como nitrato, sulfato, borato y molibdato. Equilibra la carga de iones orgánicos producidos en el metabolismo de la planta. También interviene en la regulación de algunas enzimas para la mitosis, elongación y división celular.

**Magnesio:** El sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) según, FAO (15), satisface tanto el requerimiento de magnesio y azufre requeridos por las plantas.

De acuerdo con Fuchsiarana (16), y Usui, *et al.*, (42), es el elemento central en la molécula de clorofila, e interviene decisivamente en la actividad enzimática y la producción de ATP.

## **b. Micronutrientes**

FAO (15), Señala que para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre, Cobalto, y Molibdeno. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

**Hierro:** FAO (15), considera que es requerido para la formación de precursores de la clorofila.

Usui, *et al.*, (42), señalan que normalmente se da en forma de quelato EDTA (ácido etilendinitrotetraacético) en los medios de cultivo, ya que de otra forma se precipitaría. FAO (15) indica que estos compuestos cuyas moléculas son capaces de detener un ión de un metal con varias uniones químicas formando un anillo complejo, en bajas concentraciones de EDTA estimula el crecimiento, haciendo que el hierro este disponible en bajas concentraciones.

Según Fuchsiarana (16), éste elemento es necesario para la síntesis de la clorofila, además, también forma parte de muchas enzimas y de compuestos que intervienen en la transmisión de la energía lumínica en la fotosíntesis.

**Manganeso:** FAO (15), indica que es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de Mn).

Fuchsiarana (16), menciona que interviene en muchas reacciones de la planta y es imprescindible en la formación de cloroplastos, así como también contribuye a la asimilación del nitrógeno.

**Cobre:** según Fuchsiarana (16), ésta presente en la actividad de varias enzimas que intervienen en la fotosíntesis y en el metabolismo de carbohidratos y proteínas.

**Zinc:** Según, FAO (15), es requerido para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos.

Fuchsiarana (16), menciona que es necesario para el equilibrio hormonal de la planta, en especial para la actividad de la auxina que es una hormona de crecimiento, además mejora la eficacia de la función clorofílica.

**Molibdeno:** De acuerdo a FAO (15), estos forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa. Por ello Fuchsiarana (16), menciona que es necesario para la absorción de nitrógeno, en la reducción de amonios a nitratos absorbidos en visitas a su incorporación a los aminoácidos, a pesar de no formar parte de ninguno de ellos.

**Cobalto:** FAO (15), indica que es componente de la vitamina B12.

**Boro:** Es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática y esta involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas como el uracilo, esto según FAO (15). También Fuchsiarana (16), menciona que interviene en actividades celulares (División, diferenciación, maduración, respiración y crecimiento), en la química de los carbohidratos, en el transporte de azúcares y también en la producción de algunos aminoácidos a un que no forma parte de ninguno de ellos.

## B. Vitaminas

De acuerdo con la FAO (15), son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son:

**Tiamina** (vitamina B1): Se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/L. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales, FAO (15).

**Piridocxina** (vitamina B6): ésta se añade como piridoxina-HCl, FAO (15).

**Mio-inocitol:** no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico, FAO (15).

**Ácido pantotenico:** contribuye con el crecimiento de ciertos tejidos, FAO (15).

**Ácido fólico:** disminuye la proliferación de tejidos en la oscuridad, mientras que en la luz aumenta. Esto debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico, FAO (15).

**Riboflavina:** es inhibidor del crecimiento de raíces.

**Vitamina E:** ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células, FAO (15).

### C. Reguladores del crecimiento

Estas sustancias son de naturaleza endógena, es decir, que son sintetizadas por el vegetal; además, existen otras que el hombre sintetiza, cuyas formulas químicas son similares o diferentes a las sustancias naturales pero presentan una actividad fisiológica semejante. Todas estas sustancias endógenas y de síntesis se incluyen en la categoría de reguladores del crecimiento. Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9).

De acuerdo a Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9), la presencia de hormonas vegetales se ha observado desde fines del siglo pasado, las numerosas investigaciones posteriores pusieron de manifiesto su existencia. Las primeras en ser descubiertas fueron las auxinas, en 1934; las giberelinas y las citocininas en la década de 1950. Estos tres tipos de reguladores ejercen una acción estimulante sobre el metabolismo celular.

#### a. Síntesis y degradación de la auxina Ácido Indolacético (AIA)

De acuerdo con Salisbury y Roos (35), y Bidwell (7), el AIA es químicamente similar (no igual) al aminoácido triptófano (aunque a menudo se considera 1,000 veces más diluido) y es probable que se sintetice a partir de él. Los mismo autores citan a, (Sembdner *et al.*, 1980; Cohen y Bialek, 1984; Reinecke y Bandurski, 1987), quienes indican que se conocen dos mecanismos para su síntesis, ambos con una eliminación del grupo amino y del grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del triptófano, además indican que la ruta preferida en la mayoría de las especies probablemente implique la donación del grupo amino a un alfa-cetoácido, por una reacción de transformación, para formar ácido indolpirúvico y después una descarboxilación de indolpiruvato para formar indolacetaldehído. Por ultimo, el indolacetaldehído se oxida a IAA. Por su parte las enzimas que se necesitan para la conversión de triptófano a IAA son más activas en tejidos jóvenes, tales como meristemos del tallo, hojas y frutos en crecimiento. En estos tejidos también el contenido de auxina es mayor, lo cual sugiere que el IAA se sintetiza ahí. Sin embargo, Salisbury y Roos (35), cita a McQueen-Mason y Hamilton, 1989; Tsurusaki. *et al.*, 1990 quienes indican en dos informes recientes que el IAA se deriva no de la forma  $L$  triptofano, sino de la forma  $D$  triptofano considerada no natural.

Salisbury y Roos (35), consideran que parece lógico que las plantas deban poseer mecanismos para controlar las cantidades de hormonas tan potentes como el IAA. La velocidad de síntesis es uno de estos mecanismos, y otro es la desactivación temporal mediante la formación de conjugados auxínicos. En dicho conjugado, también conocido como auxina ligada, el grupo carboxílico del IAA (el más estudiado entre las auxinas) se combina de manera covalente con otras moléculas para formar derivados. Se conocen numerosos conjugados del IAA, entre los que se incluyen el péptido ácido indolacetilaspártico y los ésteres IAA-inositol y IAA-glucosa. En general, las plantas pueden liberar IAA a partir de estos conjugados mediante hidrolasas, lo cual indica que los conjugados son una forma de almacenar IAA.

Salisbury y Roos (35), manifiestan que otros procesos para eliminar el IAA son degradativos y de estos existen dos tipos: el primero indica oxidación por  $O_2$  y pérdida del grupo carboxilo en forma de  $CO_2$ . Los productos son variables, pero casi siempre el 3-metilenoxindol es el principal. La enzima que cataliza esta reacción es la *IAA oxidasa*. Un aspecto muy importante es que las auxinas sintéticas no son destruidas por estas oxidasas, por lo que persisten en las plantas por mucho más tiempo. Las auxinas conjugadas también son resistentes a las *IAA oxidasas*.

Reinecke y Bandurski, (1987), citado por Salisbury y Roos (35), indican que en fechas recientes, se descubrió una segunda ruta para la degradación de IAA en dicotiledoneas y monocotiledoneas. En esta ruta el grupo carboxilo del IAA no se elimina, sino que se oxida al carbón 2 del anillo heterocíclico para formar ácido oxindol-3-acético, el cual ha sido oxidado en los carbonos 2 y 3 del anillo heterocíclico, sin embargo aun no se conocen los detalles de esta ruta degradativa, pero puede ser mucho más importante que aquella en la que participa la *IAA oxidasa*.

### **b. Transporte de auxinas**

Salisbury y Roos (35) y Bidwell (7), señalan que la forma en que se transporta la hormona IAA de un órgano o tejido a otro, se da en contraste con el movimiento de azúcares, iones y algunos otros solutos, aun que el IAA no suele trasladarse a través de tubos cribosos del floema o por el xilema, sino principalmente a través de células parenquimatosas que se encuentran en contacto con haces vasculares.

Jacobs, 1979; Aloni, 1987<sup>a</sup>, 1987<sup>b</sup> citado por Salisbury y Roos (35), indican que el IAA se moverá a través de tubos cribosos si se aplica a la superficie de una hoja lo bastante madura para exportar azúcares, pero el transporte normal en el tallo y peciolo es de las hojas jóvenes hacia abajo, por los haces vasculares. También las auxinas sintéticas que se administran a plantas se mueven como el IAA.

Salisbury y Roos (35), considera que el transporte tiene características que difieren de las del transporte en el floema. En primer lugar, *el movimiento de la auxina es lento*, de sólo 1cm/h en raíces y tallos, aun que es 10 veces más rápido de lo que podría esperarse por difusión. En segundo lugar, *el transporte de auxina es polar*, en tallos siempre se presenta de manera preferencial en sentido basipétalo (hacia la base), sin importar si la base está abajo como es normal o si la planta se invierte. El transporte en las raíces el transporte también es polar, pero de preferencia en sentido acropétalo (hacia los ápices). En tercer lugar, *el movimiento de la auxina requiere energía metabólica*, como lo evidencia la capacidad que tiene para bloquear inhibidores de la síntesis de ATP o la carencia de oxígeno. Otros fuertes inhibidores del transporte polar de auxinas son el ácido 2, 3, 5-triiodobenzoico (TIBA) y el ácido alfa-naftiltalámico (NPA), a aunque éstos interfieren específicamente en el transporte de auxina y no en el metabolismo energético.

### **c. Efecto de las auxinas**

Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9). Asegura que la auxina interviene en numerosos procesos fisiológicos, y su acción depende de su concentración y sus interacciones con los otros reguladores. Al estudiar los diversos efectos es posible observar lo siguiente:

1. Una clara acción sobre el crecimiento celular: este efecto se debe al número consecutivo de la plasticidad en la pared esquelética y a la penetración de agua en la célula; la resistencia de la pared disminuye y la célula se alarga. Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9).
2. La modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática que se entiende por un rechazo de iones  $H^+$ , lo que provoca una acidificación responsable de la disminución de la resistencia de la pared y absorción de iones  $K^+$ . Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9).
3. La estimulación de la división celular en las células de origen cambial (ésta acción ha posibilitado los primeros éxitos de los cultivos *in vitro*). Este efecto se ha calificado como histogéneo, ya que conduce a numerosas células, todas ellas semejantes, que forman un callo.

Las auxinas, ácido indolbutírico (IBA) y el ácido indolacético (IAA) son usados en el rango que varía de 0.1 a 10 mg/L, el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se usan en un rango de 0.001 a 10 mg/L.

#### **d. Síntesis y degradación de las citocininas**

Un paso importante para nuestro conocimiento de la biosíntesis es manifestada con los experimentos de Chong-Maw Chen y D.K. Melitz (1979), citados por Salisbury y Roos (35), quienes demostraron que los tejidos de tabaco contienen un encima llamada isopentenil AMP sintasa que forma 5'-fosfato de isopentenil adenosina (isopentenil AMP) a partir de AMP y un isómero del pirofosfato de isopentenilo. Este último compuesto es un producto del mevalonato y es un precursor importante de esteroides, giberelinas, carotenoides y otros compuestos isoprenoides. El isómero que interviene en el pirofosfato de  $\Delta$ -2-isopentenilo, en donde el prefijo  $\Delta$  quiere decir que la molécula tiene un doble enlace entre los carbonos 2 y 3. El pirofosfato se libera del nitrógeno amino fijo al carbono 6 del anillo de purina. El isopentenil AMP que se forma en esta reacción puede convertirse después en isopentenil adenosina por eliminación hidrolítica del grupo fosfato mediante una enzima fosfatasa, y la isopentenil adenosina se puede convertir luego en isopentenil adenina por eliminación hidrolítica del grupo ribosa. Además la isopentenil adenina se puede oxidar a zeatina mediante el reemplazo de un hidrógeno por un OH en un grupo metilo del lado de la cadena de isopentenilo. La dihidrozeatina se forma entonces a partir de la zeatina por reducción (con NADPH) del doble enlace de la cadena lateral del isopentenilo. Estas son las reacciones que explican la formación de las tres bases principales de citocininas, sin embargo existen otras posibilidades para su biosíntesis.

Salisbury y Roos (35), señalan que la degradación es efectuada principalmente por la citocinina oxidasa, un sistema enzimático que extrae la cadena lateral de cinco carbonos y libera adenina (o bien adenosina libre, cuando se oxida el ribósido de zeatina). La forma derivada de citocinina es más compleja debido a que se pueden formar muchos conjugados que contienen glucosa o alanina.

### **e. Transporte de citocininas**

De acuerdo con, Salisbury y Roos (35), los niveles de citocinina son máximos en órganos jóvenes (semillas, frutos y hojas) y en las puntas de la raíces, en esta última, se considera con seguridad que sí interviene en la síntesis, por que si las raíces se cortan en forma horizontal, exudan citocinina (debido a la presión de la raíz) desde el xilema de las partes inferiores restantes por periodo de hasta cuatro días. En tal sentido no es probable que estas partes inferiores puedan almacenar las suficientes citocininas derivadas de alguna otra fuente, y así actuar como fuente a plazo bastante largo para el xilema. El floema también es un medio importante de transporte de citocininas.

### **f. Efecto de las citocininas**

Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9), Al igual que las auxinas, indica que las citocininas también son muy activas y presentan las siguientes acciones a nivel celular:

1. Un efecto en la división celular, en este proceso son indispensables, pero ineficaces en ausencia de auxina; Las dos se complementan, la auxina favorece la duplicación de los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas.
2. Un papel muy claro en la organogénesis, en la que brinda estimulación considerable a la formación de yemas.
3. Las citocininas promueven la división celular y la organización de callos. Es decir, que promueven la diferenciación de yemas y brotes de callos y órganos.

### **g. Interacción auxina-citocinina**

George E., (1993), citado por Calderón (9), ha encontrado que la formación de los brotes puede ser inducido previsiblemente de callos de tabaco usando relativamente bajos niveles de auxina y altos niveles de citocinina en el medio de crecimiento. Desde este descubrimiento muchos aspectos de diferenciación celular y organogénesis en el cultivo de tejidos y órganos ha sido encontrado por una interacción entre concentraciones de citocininas y auxinas. El balance entre estas dos clases de reguladores es requerido para el crecimiento de iniciación o diferenciación en tejidos de cultivos.

Un balance entre estos reguladores del crecimiento es más requerido con frecuencia para la formación de brotes adventicios y meristemas de raíz. La concentración necesaria de cada tipo de regulador difiere mucho de acuerdo a la especie de planta, la condición del cultivo y los componentes utilizados en la interacción entre dos clases de reguladores (figura 1); Es a menudo complejo, y más que una simple combinación de sustancias es probablemente para producir resultados óptimos. Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9)



Figura 1: Interacción entre auxinas y citocininas, adaptado de Curso de cultivo de tejidos (11).

#### **h. Síntesis y degradación de las giberelinas**

Salisbury y Roos (35), e Internacional Potash Institute (24), señalan que las giberelinas son compuestos isoprenoides, específicamente dipertenos, que se sintetizan a partir de unidades acetato del acetil coenzima A en la ruta del ácido mevalónico. El pirofosfato de geranilgranilo, un compuesto de 20 carbonos, sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas. Se convierte en pirofosfato de copali, con dos sistemas de anillos, y luego en kaureno, el cual tiene cuatro sistemas de anillos. La ulterior conversión del kaureno en la ruta implica oxidaciones que se realizan en retículo endoplasmico, produciendo los compuestos intermediarios kaurenoil (un alcohol), kaurenal (un aldehído) y ácido kaurenoico; cada compuesto continúa oxidándose. El primer compuesto con un anillo giberélico verdadero el aldehído de la GA<sub>12</sub>, una molécula de 20 carbonos. De aquí surgen tanto giberelinas de 20 como de 19 carbonos. En la mayoría de giberelinas el quinto anillo (lactona) se forma a partir del carbono 19 correspondiente al grupo carboxilo del aldehído GA<sub>12</sub>.

#### **i. Transporte de giberelinas**

Salisbury y Roos (35), y Bidwell (7), indican que si encontramos estas hormonas en un órgano vegetal, pueden haber sido sintetizados o traslocados a tal sitio. Por ejemplo; las semillas inmaduras contienen cantidades relativamente elevadas de giberelinas en comparación con otras partes de la planta y los extractos libres de células de algunas especies pueden sintetizar giberelinas. Estos y otros resultados indican que gran parte del elevado contenido de giberelinas de las semillas se debe a la biosíntesis, no al transporte. La capacidad de otras partes vegetales de sintetizar giberelinas esta menos bien establecida, pero es probable que la mayoría de células vegetales tengan cierta capacidad de sintetizar giberelinas. En todo caso este tipo de hormona se pueden desplazar por vía xilema y floema.

#### **j. Efecto de las giberelinas**

Se utiliza para inducir el desarrollo de embriones adventicios. En la mayoría de los casos, se usa AG<sub>3</sub>, entre las existentes. La actividad fisiológica puede influir en el crecimiento y desarrollo de una variedad. Varios

de los efectos del AG<sub>3</sub> en todas las plantas son causados por el selectivo crecimiento o disminución en la biosíntesis y en la actividad de la enzima. Otro posible resultado es un cambio en la disponibilidad de auxinas endógenas. El ácido giberélico es descubierto para suprimir la síntesis de la fosfatasa y enzimas que tienen que ver con la producción de algunos productos secundarios y la síntesis de alfa-amilasa y maltasa son estimuladas. Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9).

Vidalie, H., (1986), citado por Calderón (9), indica que en cultivo de tejidos de plantas puede ser generalmente inducido a agrandar y diferenciarse sin giberelinas, aunque el ácido giberélico puede llegar a ser ingrediente esencial del medio para el cultivo de células en una baja densidad. Cuando el AG<sub>3</sub> es adicionado al medio de cultivo, a menudo produce un efecto que es de similar naturaleza que las auxinas. Altas concentraciones de AG<sub>3</sub> (1-8 mg/L) inducen el crecimiento de células indiferenciadas de callos, y puede promover el crecimiento de callos en combinación con auxinas y bajos rangos de citocininas.

El factor de crecimiento, que es probablemente una giberalina, es producido por la germinación de embriones de algunas especies de plantas y debe ser transmitido a él endospermo antes que el tejido prolifere para formar callos en el cultivo. Donde la presencia tanto de auxinas y citocininas en un medio de crecimiento aventaja para el acallamiento rápido en la superficie del corte de un explante. La nueva adicción de una cantidad de AG<sub>3</sub> (0.1 mg/L) o la reposición de la auxina por AG<sub>3</sub> realmente inhibe el desarrollo de callos. Vidalie, H. (1986), citado por Calderón (9).

#### **D. Aminoácidos**

De acuerdo con FAO (15), ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes.

Las funciones principales de los aminoácidos dentro del cultivo de tejidos son: La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteina es un agente reductor, FAO (15).

#### **E. Carbohidratos**

Usui, *et al.*, (42), señalan que, originalmente, las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis, sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan, y aunque lo hagan, producirán muy poco azúcar. A causa de esto, es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar.

FAO (15), indica que los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le sigue en importancia la glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/L.

## F. Agua

FAO (15), consideran que el agua a utilizar debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada, de cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final.

## G. Agentes solidificantes

De acuerdo con FAO (15), comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Indicando que las ventajas del agar son:

1. Con agua el agar forma geles que se derriten a 100° C y se solidifica a 45° C. Esto significa que éste gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
2. El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
3. El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
4. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros medios se han empleado para sustituir el agar, sin embargo pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad a alcanzado el es "Gelrite". Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir a éste, FAO (15).

Según, Usui, *et al.*, (42), el "Gelrite", es un agente gelificante que se desarrollo para micropropagación de plantas y tiene las siguientes características:

1. Requiere de un ión para gelificar, puede ser K<sup>+</sup> o Ca<sup>+</sup>.
2. Permite controlar la solidificación del medio de cultivo, mediante el cambio de volumen, clase y densidad del ión positivo.
3. Es más transparente que el agar.
4. Permite gelificar utilizando una menor cantidad que la de agar.
5. Puede volver a disolverse por recalentamiento, después de que ha gelificado.
6. Tiene resistencia al calor y a las enzimas.
7. Produce una mezcla homogénea.

## H. Suplementos no definidos.

De acuerdo con FAO (15), alguno de los suplementos utilizados ha sido:

1. Extracto de levadura.
2. Jugo y extracto de varios frutos (plátano, tomate y agua de coco).
3. Caseína hidrolizada (proteínas).
4. Antioxidantes, como el ácido ascórbico, ácido cítrico y L-cisteína.

### 5. Absorbentes como el carbón activado (CA) y Polivinylpyrrolidone (PVP).

George (18), afirma que es posible absorber o anular los compuestos inhibidores fenólicos a través de la utilización de carbón activado, sin embargo debe de utilizarse con mucha precaución ya que también es posible que pueda absorber los reguladores de crecimiento y otros componentes del medio, además también puede ser toxico para algunos tejidos.

George (18), hace mención que los bioquímicos han encontrado una forma de extraer las enzimas dentro de las plantas vivas. Estas enzimas son las que inhiben las reacciones de poli fenoles y taninos.

El PVP es utilizado como absorbente en la separación cromatografía de ácidos aromáticos, aldehídos y fenoles, que tiene un alto peso molecular. En el aislamiento de estas enzimas el PVP soluble se combina a través de enlaces de hidrogeno, absorbiendo así al fenol. También puede combinarse con óxidos de fenoles (polímeros), previniendo de esta manera la oxidación extensa de las enzimas de los poli fenoles, Jones *et al.*, (1965), citado por George (18).

Existen varios productos de PVP que difieren en cuanto a su peso molecular, los cuales son utilizados para prevenir el ennegrecimiento (Muerte de células por excesiva acumulación de compuestos fenólicos) de cultivo de tejidos, ya sea que se utilice como un enjuague de los explantes o adicionándolo directamente al medio nutritivo. George, (18).

#### 3.1.7 Medios más comunes utilizados para el cultivo de tejidos vegetales

Entre los medios más comunes utilizados para el cultivo de tejidos vegetales, Calderón (9), manifiesta que se encuentra el Medio básico de Murashige y Skoog (cuadro 21A.), el cual se empleo primero para el cultivo de callo de tabaco, pero se ha usado con amplitud para otros cultivos de tejidos; El Medio rico en sales de Murashige fue desarrollado para producir un crecimiento máximo de callo de tabaco, pero para ciertos tipos de tejidos es posible que tenga una concentración de sales muy elevada; El Medio de White primero fue desarrollado para cultivo de raíces y se ha empleado para cultivos de rutina de muchos tejidos vegetales. En ocasiones se ha modificado para plantas específicas y se ha complementado con materiales orgánicos adicionales; El Medio de solución Knudson es un medio que se emplea mucho para semillas de orquídeas y en cultivos de puntas de ramas; El medio Knop fue desarrollado primero en 1865 pero han sido modificado por varios otros. Este último también es útil para hacer crecer embriones.

## 3.2 MARCO REFERENCIAL

### 3.2.1 Origen del persimón

Standley y Williams (39), Cruz Muz (10) y AGEXPRONT (1), indican que éste árbol es originario de Asia, China y Japón. Adaptado a las regiones cálidas y templadas, donde sus frutos son consumidos en fresco o deshidratados. Constituyen un importante recurso alimenticio, puesto que contiene en estado fresco y maduros 66% de agua y 32% de azucares. Por otra parte, su contenido en vitamina C se considera equivalente al de los cítricos.

### 3.2.2 Clasificación botánica

Reino:	Plantae.
Subreino:	Embriobionta.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Magnoliopsida.
Subclase:	Dillenidae.
Orden:	Ebenales.
Familia:	Ebenaceae. (Jones (26)).
Género:	Diospyros.
Especie:	<i>Diospyros kaki</i> Linn.
Nombre común:	Persimón y Kaki. (Standley y Williams (39)).
Otros nombres:	Loto del Japón, Palo Santo, Plaquiminier, Persimoneu o Dattelpflaume, Date Plum, Lucua, Placa de minero y Kakixeiro. Cruz Muz (10) y AGEXPRONT (1).

### 3.2.3 Descripción botánicas del genero *Diospyros*

#### A. Habito

Según Standley y Williams (39), son árboles o arbustos, dióicos o raramente poligamodioicos. Cruz (10) y AGEXPRONT (1), indican que presenta un crecimiento lento, con el tronco corto, torcido, de 12-35 cm. de diámetro y de corona profusamente ramificada.

#### B. Ubicación

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), indican que en Guatemala es cultivado en altitudes de 1,300 a 2,500 msnm. como en el caso de Antigua Guatemala, Panajachel y Cobán.

#### C. Altura

Según, Cruz (10) y AGEXPRONT (1), los árboles aislados llegan a alcanzar con facilidades de 3-15 m de altura y en algunos casos hasta los 16 metros, aunque al principio su crecimiento es algo lento, pasando los tres o cuatro años comienza a fructificar y desarrollar con normalidad. La plena producción alcanza a los 15-20 años y no es raro encontrar árboles aislados de más de 50 años que dan abundantes producciones.

#### D. Características del tallo

El tallo es ligeramente angular en el principio, de color verde pálido y pubescentes, volviéndose pronto redondeado de color café o gris y con lenticelas diseminadas. Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

### E. Características de la hoja

Las hojas son dísticas, alternas, de peciolo corto, ovalado-orbiculares o elípticas, rara vez ovalado-oblongas o lanceoladas; la base esta contraída en el peciolo, el ápice es obtuso o redondeado y corto-acuminado, entero estando con frecuencia los márgenes enrollados hacia adentro para presentar una apariencia deprimida de copa, es delgada al principio, más tarde coriácea, de color verde oscuro, brillantes y pubescente (formando barras en la vena media) en el haz; de color verde pálido y pubescente al principio, volviéndose más tarde lisa, en el envés, de 5-25 cm de largo, 2.5-15 cm de ancho, pinatinervada o de 3 a 6 nervaduras en la base, las venas laterales son de 5 a 7 pares, arqueándose cerca del margen, las venas reticuladas son numerosas, visibles en ambas superficies y transparentes, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

El peciolo es redondeado en su mitad, aplanado y ancho en el lado interior, pubescente, de color verde, aplanado y de 0.5-3 cm de largo.

### F. Características de la flor

Gadner, *et al.*, (17), manifiestan que las flores pueden ser pistiladas, estaminadas ó pistiladas y estaminadas, dependiendo de la especie. Standley y Williams (39), indica que posee flores pequeñas, las cuales están dispuestas en pequeñas cimas axilares o laterales sobre ramas maduras, la inflorescencia algunas veces reducidas a una sola flor, esta flor puede ser: Estaminada con 3 a varios estambres, éstos insertos en la base de la corola o hipogíneos, los filamentos variadamente libres; anteras linear-oblongas o lanceoladas, usualmente deshiscentes por roturas laterales; y flores pistiladas usualmente con estaminodios, pero estos menos que los estambres de la flor estaminada el ovario es cónico ú oblongo, pubescente, con 1 a 4 estilos.

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), indican que las flores masculinas están unidas en cimas axilares, de 3 flores, de pedicelo corto, pequeñas, colgantes, variables en cuanto a su tamaño y de 0.8-1.8 cm de largo;

Las flores femeninas generalmente, son solitarias en las axilas de las ramitas con hojas de la temporada pasada o actual, tienen pedicelo y son colgantes; hay dos bracteas grandes, foliaceas, oblongo-lanceoladas, de color verde, de 1.5-2.5 cm de largo y de 0.5 cm de ancho; el cáliz es grande, campanulado, verde, profundamente 4 lobado tomentoso o subgrablo en ambos lados, persistente y acrecenté después de la anthesis, de 2.5-4 cm de largo y de 3 a 6 cm de extensión, siendo los segmentos ampliamente semiorbiculares, la base cortada, el ápice obtuso y de copa de 2-2.5 c. de diámetro, la corola es urceolada o tubular campanulada, de color amarillo pálido o blanco amarillento, pubescente, partida en cuatro, más o menos, a la mitad y de 2.5 a 4 cm cuando está extendida, siendo el tubo tetrágono, de 0.5-1 cm de diámetro y los segmentos avalados u ovalo-orbiculares, obtusos y de 1-1.5 cm de ancho, hay 8 ó 16 estaminodios, cuando existen 8 son libres, cuando son 16 se unen por pares, estando insertos en la base del tubo de la corola, cubiertos con pelos largos blancos y de 0.7- 1 cm de largo; el ovario es cónico, comprimido tetragonalmente o angular de 8 celdas u glabro o pubescente en su base, siendo subulado en el estilo, pubescente, partido en cuatro hasta la mitad y los estigmas son erectos. Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

## **G. Características del fruto**

El fruto es de globoso-deprimido a ovoide, oblongo o cónico, y carnososo. Standley y Williams (39).

Cruz (10) y AGEXPRONT (1). Manifiestan que el fruto es de color verde amarillento, amarillo, anaranjado o rojo con mesocarpio dulce, fundible, y el cáliz frecuentemente es muy alargado, siendo el tubo aplanado, engrosado y endurecido; los segmentos se extienden o están retraídos.

Las variedades más cultivadas son, generalmente, productores de flores femeninas por atrofia de los estambre, lo que da lugar a fructificación partenocápica, con las características antes descritas, y, por tanto, sin semillas. Es frecuente, pero no obstante encontrar dentro de la misma variedad frutos con alguna semilla, Cruz (10) y AGEXPRONT (1)

De acuerdo con, Cruz (10) y AGEXPRONT (1), el fruto es una baya comestible con peso según la variedad. La forma, dependiendo también de la variedad. Con la madurez inicialmente es de color verde más claro que la hoja, que luego adquiere un color anaranjado. En la pulpa se distinguen, en una sección transversal, las 8 variedades ováricas provistas de cada una de las semillas, cuando el óvulo ha sido fecundado en número de 1 a 8. Lo más corriente es encontrar estos frutos totalmente sin semillas, siendo estos los más apreciados y de mejor calidad.

El fruto puede producirse vía partenocárpica o por vía sexual. La diferencia no puede apreciarse exteriormente, pero si internamente cuando al partirlo se comprueba la existencia o ausencia de semilla. Los frutos producidos por partenocárpica tienen la pulpa y envainadura de color rojizo más o menos claro, muy rica en taninos, lo cual se produce un sabor áspero y astringente. No son comestibles hasta después de haber pasado un periodo de madurez que da a los frutos una consistencia blanda y un sabor muy dulce. En este caso se encuentra la mayor parte de las variedades cultivadas, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

## **H. Características de la semilla**

La semilla es oblonga, con una testa usualmente lustrosa y endospermo entero, Standley y Williams (39).

Según Cruz (10) y AGEXPRONT (1), las semillas con frecuencia son abortivas; cuando están presentes, son de 6 a 8 y aplanadas de un lado, además el albumen es uniforme.

### **3.2.4 Requerimientos climáticos y edáficos del cultivo**

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), indican que como se trata de un árbol rústico que se adapta a toda clase de suelos, ligeros, franco-arenosos o franco-arcillo-calcáreos. Su sistema radicular de gran penetración y expansión, le permite explorar en los suelos más profundos. Es más propio de tierras de regadío, pero se adapta bien a la de secano mientras sean húmedas y profundas, además, necesita una penetración media superior a 70 mm. El árbol es resistente a las bajas temperaturas, por tener frutos de maduración otoñal, y muy sensibles al frío, conociendo que dicho cultivo tolera heladas suaves donde las temperaturas deben oscilar entre los 5 y 25 °C, por ello los climas templados más o menos calurosos son los más favorables.

Los terrenos excesivamente húmedos son los menos apropiados para este cultivo. En plantaciones asociadas con naranjo y hortalizas se observa una gran caída de los frutos jóvenes, que llega a producir aclareos excesivos. Esta caída de frutos se produce en junio y julio, habiéndose comprobado que es más intensa después de riegos abundantes, por lo que estos deben espaciarse todo lo posible y evitar que el terreno quede con exceso de humedad, sobre todo en suelos arcillosos, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

### 3.2.5 Requerimientos nutricionales

Para una adecuada fertilización del cultivo es indispensable realizar un muestreo de suelos, conocer la edad del árbol, y los requerimientos nutricionales del persimón (cuadro 1), así como también los resultados del análisis foliar, ya que cada finca presenta variantes en su condición particular, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

Cuadro 1: Requerimientos nutricionales del cultivo de persimón, para una densidad de 400 árboles/ha con una edad promedio de 7 años.

<b>Absorción de nutrientes en Kg/ha/año.</b>							
Producción por hectárea.	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Mg	B	Zn	S
19.5 TM	140	99	199	23	3	2	42

Fuente: DISAGRO Y FAUSAC (1999), citado por AGEXPRONT (1).

Cave destacar que el análisis foliar es una fuente indicadora de que nutrientes aplicados y presentes en el suelo están absorbidos por los árboles, sin embargo se debe hacer una comparación con el rango óptimo de elementos de análisis foliares (cuadro 2), para realizar las enmiendas necesarias al cultivo, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

Cuadro 2: Rango óptimo de elementos en los análisis foliares en cultivo de persimón.

<b>Elementos</b>	<b>Proporciones</b>
<b>Macronutrientes</b>	<b>Porcentaje</b>
Nitrógeno (N)	1.75 – 2.50
Fósforo (P)	0.10 – 0.25
Potasio (K)	2.25 – 4.50
Calcio (Ca)	1.25 – 3.30
Magnesio (Mg)	0.18 – 0.50
Azufre (S)	0.20 – 0.45
<b>Micronutrientes</b>	<b>ppm</b>
Hierro (Fe)	50 – 150
Manganeso (Mn)	200 – 1000
Boro (B)	45 – 100
Cobre (Cu)	1.0 – 10
Zinc (Zn)	5.0 – 45

Fuente: Mills, HA; y Jones JB (1996), citado por AGEXPRONT (1).

### 3.2.6 Tipos de patrones

Cruz (10), indica que dos son los patrones o porta injertos más empleados en el persimón: el procedente de las semillas de los frutos comestibles y el de las semillas de *D. Lotus* o *D. Virginiana*. El primero, que podemos denominar como franco, al proceder de semilla de persimón tiene escasa importancia y es de empleo muy reducido, ya que la germinación de tal sé milla es defectuosa o no es viable y al mismo tiempo da lugar a patrones poco vigorosos, por lo que las plantas que sobre estos se injertan, adquieren poco desarrollo y son muy irregulares.

Cruz (10), indica que el patrón más comúnmente empleado y que proporciona las mejores características, es el procedente de semillas de *D. Lotus*, de germinación más regular. En Italia, el *D. Lotus* es el porta injerto más empleado, mientras que en Estados Unidos se emplea principalmente *D. Virginiana*. Carbo Gómez citado por Cruz (10), propone que los semilleros se hagan al principio del verano, en densidades de siembra muy pequeñas. Llegado el invierno se pasan a trasplante al vivero y en marzo ya pueden injertarse.

### 3.2.7 Propagación

Según Cruz (10) y AGEXPRONT (1), la propagación se hace por medio de chupones (brotes) de la raíz, o injertos. Estos últimos se pueden realizar en cualquier época del año utilizando patrones de persimón americano (*D. Virginiana*).

Los injertos o las plantas de semillas son difíciles de trasplantar debido a que cuentan con una raíz pivotante larga, por lo tanto debe empezarse temprano el trasplante al terreno definitivo, con la poda siguiente y limitada a remover la madera muerta y ramas entrecruzadas. Otro de los factores importantes es que los árboles jóvenes, necesitan cantidades abundantes de fertilizantes en su base, obteniendo un crecimiento adecuado y reducir al mínimo la competencia vegetal. Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

#### A. Injerto

AGEXPRONT (1), indica que si se emplea uno u otro injerto, es necesario recurrir al injerto como medio de propagar las características varietales. El injerto tradicionalmente se realiza por el método de hendidura simple. Para ello se poda el patrón, a unos 5 cm. sobre del suelo, colocando una sola púa con dos o tres yemas sobre la abertura practicada en la cabeza del patrón. Posteriormente se ata con nailon y se cubre la zona del injerto con cera o algún tipo de cinta aislante.

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), manifiestan que el injerto de escudéte se practica muy poco, aunque puede realizarse procurando retrasar su ejecución hasta septiembre, cuando ya ha comenzado el descenso de la savia. Si se injerta de escudéte cuando no hay plena actividad de savia, se corre el riesgo, de producirse un ahogo de las yemas por un exceso de afluencia de savia.

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), indican que después de tres o cuatro años del injerto, las plantas empiezan a cargarse de fruta y esta producción continua durante casi toda la vida de la planta. Por esa extraordinaria cantidad de fruta, las ramas de la base se pliegan y entonces es ventajoso un despuntado de las ramas superiores, para mantener la planta en equilibrio, disminuyendo la producción.

Se injerta de púa o hendidura en el principio de verano (Sacatepéquez), o de escudéte en la misma época, utilizando yemas procedentes de ramas de madera de los años anteriores cortados en invierno y conservados. También se utilizan el sistema de yema, procedente de ramas de madera del mismo año, a fin del verano, Cruz (10).

Cruz (10), menciona que también se propaga por chupones e injertos de yema de otro tipo. Se puede usar como patrones el níspero americano o el níspero asiático (*D. Lotus*). Este se prefiere para áreas secas, aunque en California prefieren el *D. kaki*. Para hacer el injerto de yema, las plantulaza se colocan en bolsas de polietileno o se envuelven. La plantación se hace en el terreno, con una separación de 7.5 por 7.5 metros. Y las mejores variedades empiezan a fructificar en 3 ó 4 años.

## B. Variedades

De acuerdo con Cruz (10) y AGEXPRONT (1), por ser una especie poco estudiada, y ha la que sé a prestado poca atención a la hora de denominar las variedades, existe gran confusión, no solo entre los agricultores, si no también en autores y viveristas. Si a esto unimos la difícil pronunciación de los nombres orientales de la mayoría de las variedades, comprendemos por que cada agricultor les da en cada zona unos nombres distintos y peculiares.

Cruz (10) y AGEXPRONT (1), Hacen mención que las cuatro variedades más difundidas y mejor diferenciadas por la forma se sus frutos son:

**Hachiya:** es la más cultivada, por su magnifica calidad (Resistencia al transporte y a los ataques de mosca del mediterráneo *Cetatitis capitata*, coloración anaranjada uniforme y diámetro de 8 a 10 cm.). Se conoce en muchos lugares con el nombre de “tomatero” por su forma perecida al tomate, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

**Toyama:** Llamado vulgar mente “gordo, por su gran tamaño, bastante más grueso que el tomatro, es menos resistente al transporte y muy afectado por los ataques de *Cetatitis*. La recolección de esta variedad comienza a mediados de septiembre. Es la menos apreciada de las cuatro variedades que describimos, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

**Kostata:** Llamado también “picudo”, por su forma puntiaguda o trompo. Resiste también al transporte, pero en ocasiones se desprende del árbol antes de llegar a la recolección que viene a realizarse en la segunda quincena de septiembre o primeros de octubre, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

**Diospyros de frutos pequeños:** Pertenecen a las dos especies *Diospyros Lotus* y *Diospyros Virginiana* que proceden del Asia Menor. Sirven de porta injerto a las otras especies de frutos comestibles. Se multiplica por semilla en los meses de febrero o marzo, Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

### 3.2.8 Enfermedades

Dentro de las enfermedades que atacan al cultivo de persimón se encuentran las que mencionamos en el cuadro 3, en el cual se detallan los síntomas y signos de las enfermedades, así como su control cultural y químico.

Cuadro 3: Principales enfermedades fungosas que atacan al cultivo de persimón, AGEXPRONT (1) e Infoagro (23).

Agente causal	Síntomas y signos	Control cultural	Control químico
<i>Cercospora diospyrae cooke.</i>	Ataca hojas, e inicia con manchas de forma circular con diámetros de 2 a 6 mm y coloración blanco grisáceo en el haz y negrusco en el envés. Al unirse, secan las hojas y es más severa a principios de las lluvias y con más intensidad durante las mismas.	Regulación de entrada de luz, control adecuado de malezas, densidad de siembra y fertilización adecuada.	Aspersiones con funguicidas protectantes como Oxicloruro de cobre en dosis de 2 a 2.5 kg/ha.
Gomosis <i>Phytophthora parasitica.</i>	Se presenta en la corteza del tronco, corteza de la raíz y ramas bajas. El árbol se debilita hasta que muere la corteza progresivamente y fácilmente se descascara.	Evitar heridas al árbol, realizar una poda adecuada, y control de malezas	Aplicar con una brocha en la herida una pasta con 0.5 kg de Oxicloruro de cobre mas 2 kg de cal o yeso y con ambas hacer una mezcla pastosa.
Fumagina <i>Capnodium sp.</i>	Se caracteriza por la formación de una película fina de polvo negro que cubre la hoja, ramas y frutos. Es provocado por la presencia de insectos chupadores, ya que el hongo se desarrolla en los azúcares defecados por los insectos.	Control adecuado de malezas que sirvan como hospedantes de insectos chupadores.	Aplicación de insecticidas sistémicos, específicos para insectos chupadores Oxidementon metil.
Antracnosis <i>Colletotrichum sp.</i>	Son manchas acuosas hundidas en forma de anillos concéntricos café claro.	No se debe sembrar en suelos con mal drenaje, manejo adecuado de la sombra y eliminar frutos dañados	Aplicación de Oxicloruro de cobre a razón de 2 a 2.5 kg/ha.
<i>Armillaria mellea.</i>	Se introduce entre la madera y la corteza de las raíces, prácticamente inaccesible a la lucha química.	La lucha contra <i>A. Mellea</i> se reduce a arrancar y quemar los tocones y raíces de árboles enfermos, para reducir el inóculo en el suelo; se debe limitar las aportaciones de riego, evitar el exceso de humedad, reducir la materia orgánica y emplear abonos minerales.	Es eficaz la lucha biológica empleando <i>Trichoderma viride</i> debido a sus propiedades antagonistas respecto a <i>A. Mellea</i> , ya que reducen el inicio y crecimiento de los rizomorfos subterráneos pero éste método de lucha ésta ligado al pH del suelo y a la persistencia de sustratos orgánicos que permitan un desarrollo de otros organismos competidores ya instalados.

Fuente: Cruz (10) y AGEXPRONT (1).

### 3.2.9 Situación actual de la comercialización y precios en el mercado

Eligiendo una variedad productiva y resistente al transporte, como la Hachiya, se puede conseguir un largo periodo de aprovechamiento en fresco desde su recolección, lo que constituye una gran ventaja para el comerciante y consumidor, frente a la opinión que se tiene de este fruto, debido a las características de otras variedades existentes muy susceptibles a golpes y que han dado una idea errónea de ser un fruto de difícil comercialización y transporte, lo cual hace pensar a los agricultores y comerciantes no extender este cultivo, Cruz (10). El mismo autor indica que es un fruto con gran cantidad de azúcares y vitamina C, su sabor excesivamente dulce y de consistencia blanda.

Benítez Coronado (6), en su artículo "Potencialidades agronómicas y económicas de la producción de persimón en Guatemala", hace referencia a los resultados realizados por la consultora canadiense GEOMAR-MI, contratada para el efecto, determinando que el fruto de persimón (en fresco y deshidratado) tiene mercado en Estados Unidos, Canadá, Unión Europea, Mercado Asiático y MERCOSUR. Por ende el persimón es uno de los 10 nuevos cultivos que se pueden impulsar en nuestro país.

Trabajos realizados por AGEXPRONT consideran éste fruto entre los 25 cultivos potenciales para Guatemala, AGEXPRONT (1).

El precio de la caja de 10 libras, en el mercado local (supermercados especialmente), oscila entre Q60.00 y Q80.00; además se tiene referencia de que en Inglaterra, el precio al público, por cada fruta, es de US \$2.00. Benitez Coronado (6).

### 3.2.10 Zonas potenciales de producción en Guatemala

La AGEXPRONT (1), en la actualidad ha determinado que la producción nacional no es significativa, ya que son contados los productores que se dedican a producir persimón en pequeños huertos con calidad, sin embargo, gracias a las condiciones agro-climáticas privilegiadas, en Guatemala existe un enorme potencial agronómico para la producción de este cultivo. Sobre todo en aquellas áreas productoras ubicadas entre 1300 y 2500 msnm, donde sería posible producir persimón de alta calidad, de acuerdo a los requerimientos del mercado internacional en cuanto a tamaño, color, sabor, etc.

Según la AGEXPRONT (1), dentro de los departamentos con potencial para la producción de persimón tenemos: Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Totonicapán, Solola, Quetzaltenango y San Marcos. En el cuadro 4 se detalla esta información.

Cuadro 4: Zonas potenciales de producción de persimón en Guatemala.

DEPARTAMENTOS	NUMERO DE PRODUCTORES INVOLUCRADOS	ÁREA DE PRODUCCIÓN DESTINADA A ESTE CULTIVO (ha)	VOLUMEN DE PRODUCCIÓN ESPERADO (toneladas métricas)
Quetzaltenango	800	200	3,900.00
San Marcos	600	150	2,925.00
Quiché	280	70	1,365.00
Alta Verapaz	800	200	3,900.00
Baja Verapaz	400	100	1,950.00
Totonicapán	400	100	1,950.00
Sacatepéquez	300	75	1,462.50
Solola	300	75	1,462.50
Chimaltenango	300	75	1,462.50
Guatemala	200	50	975.00

Rendimiento promedio de 19.5 TM, tomado en base a costos de producción por hectárea.

Fuente: Planes estratégicos de desarrollo, MAGA 1999 y Cálculos GEOMAR/UPADI 2000, citado por AGEXPRONT (1).

### 3.2.11 Rendimiento del cultivo

La AGEXPRONT (1), da a conocer que los árboles de persimón comienzan a producir al tercer año de plantado, obteniéndose un mínimo de 20 frutos por árbol, al cuarto año se producen de 30 a 50 frutos promedio y en los años sucesivos aumenta la producción a un promedio de 100 a 300 por árbol. Por ello los rendimientos esperados pueden variar de 62.400 a 187.200 frutos/ha, equivalentes a 14 ó 25 TM/ha, claro esta que estos rendimientos dependen del lugar de siembra, las distancias y cuidado que se le de al cultivo. Los árboles más viejos tienden a producir grandes cosechas por su tamaño y pueden requerir el aclaréo de la fruta; ellos también

pueden responder con altos rendimientos si las aplicaciones de fertilizantes son las adecuadas y asimiladas eficientemente.

### 3.2.12 Antecedentes de micropropagación en *Diospyros kaki*

Murayama, *et al.*, (30), reportan haber tenido éxito en la propagación *in vitro* de Persimón Japonés vr. Hiratanenashi. En ésta investigación, utilizaron brotes axilares inactivos de árboles con más de 50 años de edad. En el proceso de desinfección, reportan haber utilizado cloro al 1% más 0.1% de Tween 20, durante 10 minutos, posteriormente se enjuagó 4 veces con agua estéril. Luego se disectaron explantes de 2 mm con la ayuda de un estereoscopio, para ello se utilizaron las puntas de los retoños que contenían porciones apicales, y éstos explantes fueron colocados individualmente en tubos de ensayo de 2.3 por 15 cm. conteniendo 20 ml. de medio solidificado.

En dicha investigación se evaluaron cinco medios nutritivos (M&S básico, M&S ( $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub>), Nitsch & Nitsch, Lepoivre y WPM). Todos los medios fueron suplementados por separado con BAP en concentraciones de 4.4, 8.9, 22.2, 44.4 y 88.9  $\mu$ M y 2iP 4.9, 9.8, 24.6, 49.3 y 98.5  $\mu$ M, por un periodo de 40 días, Murayama, *et al.*, (30).

De lo anterior concluyeron que el medio nutritivo más adecuado fue el M&S  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub>, seguido por WPM, además las concentraciones más adecuadas de citocininas para la inducción de brotes, en el caso de BAP fue de 22.2 $\mu$ M (5 mg/L) la cual produjo un promedio de 7 brotes por explante y en el caso de 2iP, la concentración fue de 49.3 $\mu$ M (10 mg/L) produciendo únicamente 3 brotes por explante. Además para la variable largo de tallo de brote, la concentración de la citocinina 2iP 24.6 $\mu$ M (5 mg/L), en promedio indujo un tallo de 1.5 cm. de alto y la BAP en promedio únicamente 0.8 cm. con una concentración de 8.9 $\mu$ M (2 mg/L), Murayama, *et al.*, (30).

Para la fase de enraizamiento reportan haber sumergido la base de los explantes de 2 cm. por unos segundos en etanol al 50% y posteriormente 30 segundos en una solución de IBA a 1.23 $\mu$ M (250 mg/L), para luego seguir siendo cultivados en el M&S  $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub> sin reguladores, Murayama, *et al.*, (30).

Kupter (27), ésta investigación fue basada en la metodología utilizada por Murayama *et al.* (1986). Para ello los ápices del retoños fueron sometidos a un proceso de desinfección, en el cual se utilizo un lavado con cloro y 5% de hipoclorito de sodio, con manosol y posteriormente se enjuagó tres veces con agua destilada.

El establecimiento de los explantes se realizó en un medio modificado de M&S, con la mitad de concentración de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub>, además suplementado con 0.1 mg/L de GA<sub>3</sub>, BAP o 2iP según fue el caso, Kupter (27).

En esta investigación Kupter (27), reportó que avaluó el medio "A" (M&S  $\frac{1}{2}$  NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> más 0.1 mg/L de GA<sub>3</sub> y 1.0 mg/L de BAP) y el medio "B" (M&S  $\frac{1}{2}$  NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> más 0.1 mg/L de GA<sub>3</sub> y con 5mg/L de 2iP).

Dentro de los resultados que el mismo autor reportó, en ambos medios "A" y "B" se observo un efecto de vitrificación, necrosis y el crecimiento de los explantes con un alargamiento, pero en forma de rosetón, estos efectos de vitrificación y necrosis no fue posible controlarlos con subcultivos frecuentes, Kupter (27).

Tetsumura, *et al.*, (40), reportan haber utilizado la metodología descrita por Murayama, *et al.*, (1989), utilizando brotes en estado de letargo, a los cuales se les extrajo como explante el meristemo de 2 mm

aproximadamente. Se evaluaron 25 variedades bajo estrictas condiciones de asepsia y se sembraron en el medio de M&S ½ N (la mitad de la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ ). Después de que las variedades se fijaron al medio, estas fueron transferidas durante tres veces con 22.2  $\mu\text{M}$  de BAP o 25  $\mu\text{M}$  de 2ip. En éste experimento se trato de establecer un efecto entre las dos citocininas utilizadas para la multiplicación y elongación de brote. Posteriormente después que los brotes tenían un tamaño adecuado (8 a 26 mm), luego de ser transferidos a un medio con Zeatina 10  $\mu\text{M}$ , estos fueron sumergidos en una solución de 1.23  $\mu\text{M}$  IBA y se sembraron en el medio M&S ½ N sin hormonas, se trato de inducir la proliferación de raíz en la oscuridad durante 10 días. Las condiciones del experimento tenían una temperatura de 28 °C, con un fotoperíodo de 16 horas luz, el medio contenía 3% de sacarosa y 0.8% de agar.

Según los resultados de este experimento, Tetsunura *et al.*, (40) reporta que se lograron establecer 23 variedades de 25, utilizando zeatina a 10  $\mu\text{M}$ . Las variedades llamadas “kodagosyo” y “Kousyuhyakumome” no se logro establecer en el medio con BAP, ni zeatina. En el caso de BA y 2iP únicamente se establecieron 8 variedades de las 25 evaluadas, las cuales fueron Hazegoshō, Hiratanenashi, Jiro, Kakiyamagaki, Kurogaki, Metogaki, Mushirodagoshō y Nagara.

Según lo demuestra Tetsunura, *et al.*, (40), el efecto de las citocininas es muy evidente, ya que con las variedades establecidas con BAP el número de brotes se incremento unas 4 ó 5 veces en comparación a los establecidos con zeatina, sin embargo existe una mayor elongación en las variedades establecidas con zeatina en comparación a las establecidas con BAP.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

4.1.1 Estudiar la respuesta del Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya al cultivo de tejidos *in vitro*.

### 4.2 ESPECÍFICOS.

4.2.1 Encontrar un periodo de exposición a la solución desinfectante y concentración de hipoclorito de sodio que no provoque daño a los explantes de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya.

4.2.2 Determinar la concentración de antioxidantes, absorbentes y modificaciones del medio nutritivo básico Murashige y Skoog, que controlen la oxidación y necrosis de explantes de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya.

4.2.3 Establecer la concentración de 6-bencilaminopurina que permita la inducción de brotes de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya.

4.2.4 Determinar la concentración de ácido indolbutírico ó ácido indolacético que permita la inducción de raíces en brotes de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya.

## 5. HIPÓTESIS

- 5.1 Es factible que en un periodo de exposición a la solución desinfectante y concentración de hipoclorito de sodio no provoque daños al explante de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya en el proceso de desinfectación.
- 5.2 Mediante el manejo de las concentraciones de antioxidante, absorbentes o modificación del medio básico Murashige y Skoog se controlan la oxidación y necrosis de los explantes de Persimón *Diospyros kaki* L. Var. Hachiya.
- 5.3 Es factible que una de las concentraciones de 6-bencilaminopurina permita la inducción de brotes de persimón var. Hachiya.
- 5.4 Es posible que una de las concentraciones de ácido indolbutírico ó ácido indolacético permita la inducción de raíces en brotes de persimón var. Hachiya.

## 6. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El laboratorio se encuentra ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T-8, en la ciudad universitaria, zona 12 de la Ciudad de Guatemala. El laboratorio cuenta con instalaciones, equipo condiciones de luz, temperatura y un aislamiento adecuado.

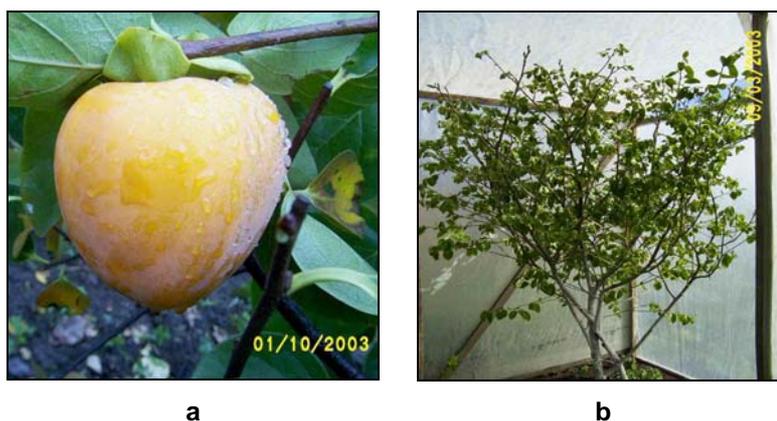
En el desarrollo de ésta investigación se tomaron en cuenta aspectos como la sanidad, tipo y época en que se colecto el material vegetal (explante), así como también, la evaluación del medio reportado como el más idóneo para este cultivo; para contrarrestar la oxidación y necrosis del explante se valoraron antioxidantes y absorbentes; posteriormente se sometió a evaluación diferentes concentraciones de citocininas y auxinas para inducción de brotes y enraizamiento respectivamente. Los procesos indicados se organizaron en cinco fases.

### 6.1 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 6.1.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre

El material vegetal que se utilizó, provino de plantaciones de *Diospyros kaki* L. variedad Hachiya, de 8 años de edad, existentes en la localidad de San Bartolomé Milpas Altas, Sacatepéquez. El material recolectado fue del árbol más sobresaliente en rendimiento, vigorosidad y tolerancia a enfermedades, tamaño y color de fruto (figura 2a).

Para garantizar la sanidad del árbol, fue indispensable el aislamiento del mismo, 3 meses previos a la obtención de explantes. Para dicho aislamiento se utilizó plástico para invernadero (figura 2b), además se realizaron aplicaciones de fungicidas preventivos y curativos de acción por contacto y sistémico.



Fuente: Aspuaca Apxuac, JR. 2003.

Figura 2: Árbol y fruto de persimón Var. Hachiya. a) Fruto que produce el árbol seleccionado como el material más sobresaliente de la plantación de persimón variedad Hachiya localizado en San Bartolomé Milpas Altas Sacatepéquez. b) Árbol aislado con plástico de invernadero, para garantizar la sanidad de los explantes que se utilizaron en la investigación.

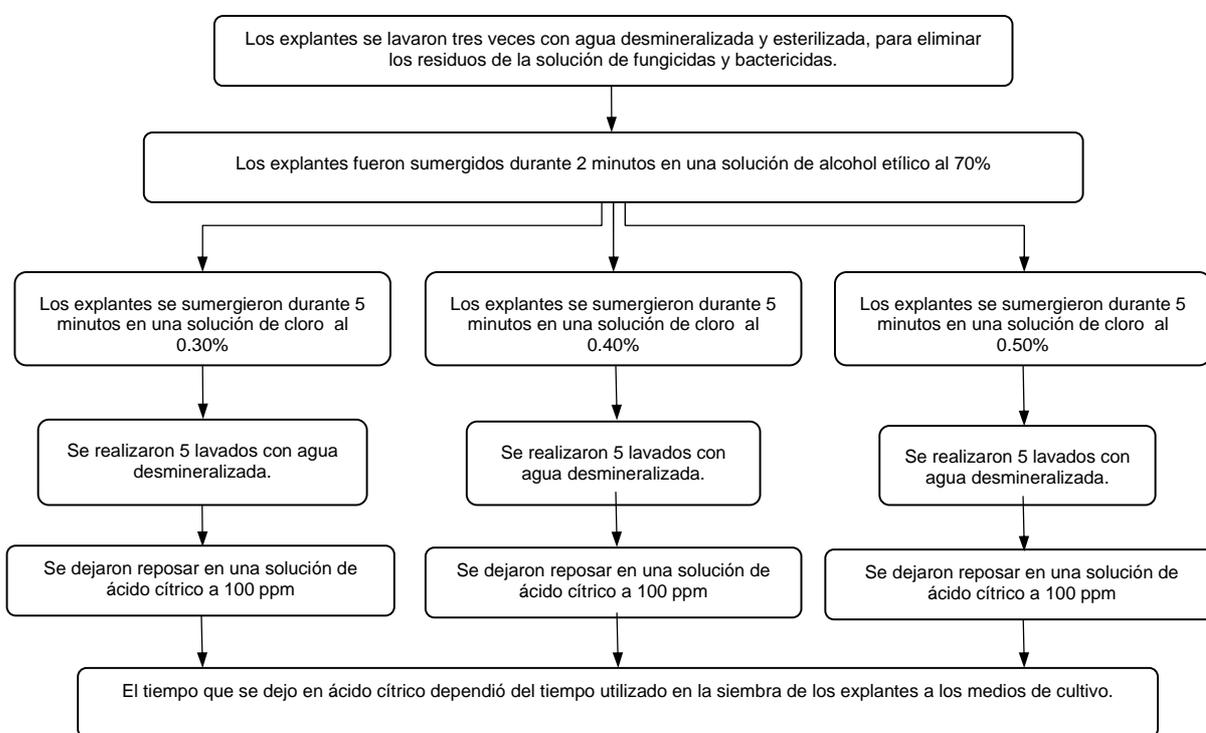
### 6.1.2 Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

Esta fase de la investigación dio comienzo con la colecta del material. Inicialmente el material colectado fue lavado con agua y detergente, con el objetivo de eliminar partículas adheridas al material

#### A. Tratamientos

Se realizaron tres tratamientos los cuales consistieron en 12, 6 y 3 horas de exposición de explantes a una solución desinfectante, realizándose para ello el sumergimiento del material en una solución de fungicida (bencimidazol-benomil) al 0.1%, bactericida (sulfato de cobre pentahidratado) al 0.15% y ácido cítrico a 0.4%, por periodos de 12, 6 y 3 horas tiempo en el cual también fue trasladado a las instalaciones del laboratorio.

Posteriormente se realizó la desinfección bajo condiciones de asepsia, en la cual se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio utilizando para ello el procedimiento descrito en el la figura 3.



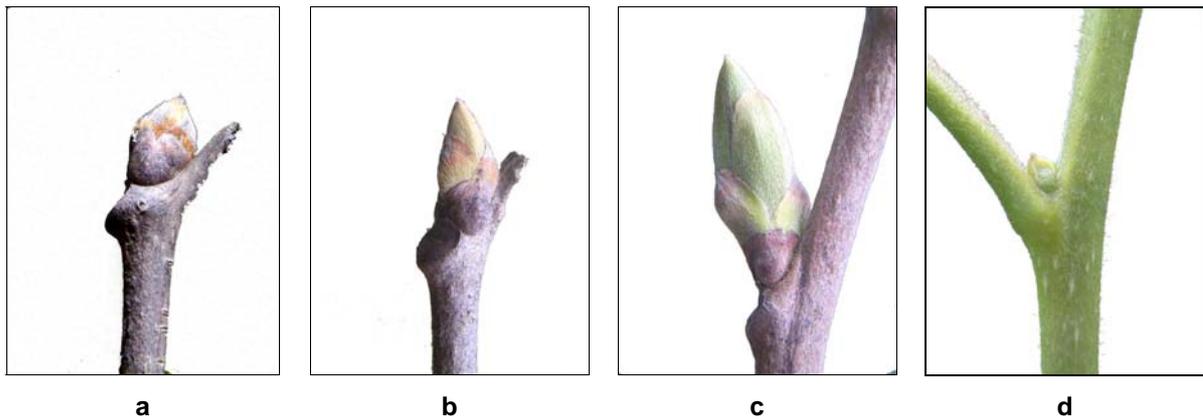
Fuente: Aspuaca Axpucac, JR. 2003.

Figura 3: Procedimientos utilizados en la desinfección, para observar el daño causado a los explantes por las diferentes concentraciones diluidas de cloro y determinar la concentración más viable.

Los resultados fueron observados durante el transcurso en que los explantes se sumergieron en la solución diluida de cloro, hasta finalizar el proceso de desinfección.

#### B. Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un explante el cual presentaba un tallo de aproximadamente 2 cm de largo con una yema lateral Figura 4d.



Fuente: Aspuaca Axpucac, JR. 2003.

Figura 4: Yemas de Persimón var. Hachiya en sus diferentes fases de desarrollo. **a)** Yema en estado de dormancia. Se utilizó como explante ápices axilares (meristemo de aproximadamente 1 a 2 mm y 2 primordios foliares), éste material puede colectarse durante julio a enero. **b)** Yema que termina su estado de dormancia y empieza con el crecimiento anual. Se utilizó como explante, el ápice y 4 a 5 primordios foliares. Este material puede recolectarse durante febrero y primeras semanas de marzo. **c)** Yemas en pleno crecimiento anual. No utilizado por lo sensible al proceso de desinfección y elevado porcentaje de oxidación. **d)** Yema que ha terminado su crecimiento anual. Se utilizó como explante una yema y aproximadamente 1 cm de tallo. Este material puede colectarse de abril a junio.

### C. Variables de respuesta

Las variables de respuesta que se evaluaron en esta fase de la investigación son las siguientes.

- a). Daño causado en la superficie de los explantes.
- b). Cambio de coloración de explantes

### D. Análisis de la información

La información de ésta fase de la investigación se analizó utilizando estadística descriptiva, la cual nos permite describir y comprar, detallando cada uno de los resultados de las variables evaluadas.

### E. Presentación de resultados

Los resultados obtenidos se reportan recalcando el tratamiento que indujo un mayor control de daños causados a los explantes por la exposición de desinfectantes.

#### 6.1.3 Fase II: Control de oscurecimiento oxidativo y muerte del explante

Según la literatura citada, los trabajos realizados en la micropropagación de diferentes variedades de persimón, únicamente Kupter (27), reporta problemas de oxidación y vitrificación, utilizando la transferencia a nuevos medios como método para minimizar dichos problemas, sin embargo, reporta que estos problemas de oxidación y vitrificación continuaron pese a las transferencias. Trabajos realizados por Murayama, *et al.*, (30) y Tetsumura, *et al.*, (40), no se reportan problemas de oxidación y muerte del explante, utilizando el medio básico M&S (reduciendo a la mitad su concentración de sales), por ende, ninguna metodología que pueda ser utilizada como punto de partida, para evaluar el comportamiento de la variedad Hachiya. Sin embargo al realizar la

siembra de los explantes en el medio de cultivo (yemas con un centímetro de tallo), se observó que el material al cabo de dos o tres días moría.

#### A. Tratamientos

Con el propósito de minimizar y contrarrestar la muerte de los explantes, se evaluaron productos antioxidantes como ácido cítrico y L-cisteína (cuadro 5).

Cuadro 5: Concentraciones de antioxidantes como ácido cítrico y L-cisteína evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).

Tratamientos	Ácido cítrico (ppm)	L-cisteína (ppm)
T1	0	0
T2	50 <sup>ac</sup>	0
T3	100 <sup>abc</sup>	0
T4	150 <sup>abc</sup>	0
T5	0	50 <sup>ac</sup>
T6	0	100 <sup>ac</sup>
T7	0	150 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup> Calderon (9).

<sup>b</sup> George (18).

<sup>c</sup> Mak Milán Cruz. 2003. Concentraciones de ácido cítrico y L-cisteína (entrevista). FAUSAC.

Al observar que el efecto de los antioxidantes fue similar al testigo, se evaluaron Carbón activado y Polivinylpyrrolidone (cuadro 6) absorbentes y dispersantes que según Sierra, *et al.*, (36), se han obtenido resultados satisfactorios en diversos cultivos.

Cuadro 6: Concentraciones de absorbentes como Carbón activado y Polivinylpyrrolidone evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).

Tratamientos	Carbón activado (CA) ppm.	Polivinylpyrrolidone (PVP) ppm.
T1	0	0
T2	5000 <sup>de</sup>	0
T3	10000 <sup>de</sup>	0
T4	15000 <sup>de</sup>	0
T5	0	300 <sup>d</sup>
T6	0	600 <sup>d</sup>
T7	0	900 <sup>d</sup>
T8	0	1000 <sup>d</sup>
T9	0	3000 <sup>d</sup>
T10	0	6000 <sup>d</sup>

<sup>d</sup> Mak Milán Cruz. 2003. Concentraciones de CA y PVP (entrevista). FAUSAC.

<sup>e</sup> Cabrera Morales (8)

Observando que el efecto de los absorbentes fue similar al testigo, con excepción de los tratamientos de PVP, donde la muerte del explante se retrasó por algunos días en las 6 dosis evaluadas, se procedió a evaluar el comportamiento del medio básico M&S en estado líquido (reducido a la mitad de la concentración de sales), utilizando puentes de papel filtro, así como la dosis mínima 300 ppm de PVP (Cuadro 7).

Cuadro 7: Evaluación de medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), para obtener un medio líquido y para limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo) con el medio nutritivo, utilizando puentes de papel filtro.

Tratamientos	Polivinylypyrrolidone (PVP) (ppm)
T1	0
T2	300 <sup>f</sup>

<sup>f</sup> Concentración determinada como la más adecuada, en función de costo de reactivo y efectividad de la concentración mínima o máxima evaluadas con anterioridad en medios sólidos.

La muerte del explante en medios líquidos fue retrasada por el lapso de un mes. Presentando menor porcentaje de oxidación el medio líquido con PVP, en comparación al testigo.

Posteriormente se evaluó el medio básico M&S al 100, 75, 50, 25 y 0% de concentración de todos sus componentes, adicionando dos diferentes concentraciones de PVP (cuadro 8).

Cuadro 8: Diferentes concentraciones del medio básico M&S y dos dosis diferentes de PVP. Utilizando como explantes yemas con 1 cm de tallo.

Tratamientos	M&S (Porcentaje)	Polivinylypyrrolidone (PVP) (ppm)
T1	0	0
T2	25	0
T3	50	0
T4	75	0
T5	100	0
T6	0	300
T7	25	300
T8	50	300
T9	75	300
T10	100	300
T11	0	600
T12	25	600
T13	50	600
T14	75	600
T15	100	600

Al observar las distintas concentraciones del medio, se pudo observar que al aumentar las concentraciones del medio M&S la muerte del explante era más evidente y agresiva.

Basándose en los anteriores ensayos e información recabada por Encinas (13) y George (18), donde afirman que no todos los cultivos son tolerantes a las altas concentraciones de los componentes del medio nutritivo, se optó por modificar el medio básico M&S. Ya que las investigaciones realizadas por Murayama, *et al.*, al evaluar los cinco medios nutritivos (M&S básico, M&S ( $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub>), Nitsch & Nitsch, Lepoivre y WPM), determinó que el medio más adecuado fue el M&S ( $\frac{1}{2}$  NO<sub>3</sub>), seguido por el medio WPM.

Para poder realizar éstas modificaciones a las concentraciones de los diferentes componentes utilizados en este medio, fue indispensable conocer los requerimientos nutricionales del cultivo, así como las concentraciones y rangos óptimos de elementos en análisis foliares del persimón (cuadro 2).

La modificación del medio básico M&S (Cuadro 21A) al nuevo medio M&S modificado al cual se optó por identificarlo con el nombre "**M&S básico modificado**" (Cuadro 22A). Este nuevo medio solucionó los problemas de muerte del explante, estableciéndose un medio específico, el cual proporcionó a los explantes una concentración y proporción adecuada de macro y micro nutrientes para este cultivo en específico.

La concentraciones de los componentes del medios básico M&S fueron ajustadas (Cuadro 23A), de tal manera que los elementos nutritivos se encontraran en el rango optimo (figuras 15A y 16A), el cual fuese tolerado por el tamaño del explante. Sabiendo que los análisis foliares, son trabajados en base a peso seco, y el rango optimo de elementos establecidos en análisis foliares se expresan, para el caso de los macro nutrientes en porcentajes P/P. En la siguiente ecuación de muestran los cálculos para determinar las ppm del rango de nitrógeno del cuadro 2, el cual indica las proporciones mínimas y máximas reportadas en los análisis foliares indicadores del rango óptimo de elementos.

$$\text{ppm} = \% \frac{P}{p} \times 10,000 = \frac{1.75 \text{ mg N}}{100 \text{ mg PBS}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{\text{gr}} \times \frac{1000 \text{ gr}}{\text{kg}} = \frac{17,500 \text{ mg N}}{\text{kg PBS}} = 17,500 \text{ ppm de N}$$

Luego de obtener las ppm mínimas de N en base a peso seco (PBS), se calculó las ppm mínimas de N que debería contener un litro de medio "M&S básico modificado". El siguiente paso, fue calcular las ppm mínimas y máximas de cada elemento para un litro de medio nutritivo, utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg minimo de N}}{\text{litro de medio}} = \frac{17500 \text{ mg N}}{\text{kg PBS}} \times \frac{1\text{kg}}{1000\text{gr}} \times \frac{0.024475 \text{ gr PBS}}{1\text{Explante}} \times \frac{100 \text{ Explantes}}{1\text{Litro de Solución}} = \frac{42.8312 \text{ ppm minimo de N}}{\text{litro de medio}}$$

Estos cálculos se realizaron para cada uno de los elementos reportados en el cuadro 2. El siguiente paso fue establecer un valor intermedio de cada rango de elementos. El valor encontrado para el caso del Nitrógeno fue de 52.009375 mg N/lit de medio. De los cálculos que se presentan en el Cuadro 23A, se obtuvo la sumatoria de los gramos de N (como elemento) de todos los compuestos o reactivos utilizados para la elaboración del medio, y se comparo con los 52.009375 ppm de Nitrógeno. Para obtener un valor aproximado, se modificaron según fuese necesario las concentraciones que se utilizarían en el medio, colocando especial énfasis en que la sumatoria de mg de los elementos aportados por los compuestos, se lograran acoplar al rango establecido. Los resultados de estos cálculos se efectuaron con la ayuda de una hoja electrónica (Excel, versión XP), los cuales se presentan en el Cuadro 23A y las figuras 16A y 17A, obteniendo como resultado el medio "M&S básico modificado" descrito en el Cuadro 22A.

El tipo y época de colecta de explante, fue determinante en esta fase ya que con el nuevo medio “M&S básico modificado” y el medio básico M&S se evaluaron yemas en estado de dormancia (figura 3a), así como también yemas que han terminado su crecimiento anual (figura 3d), siendo las primeras las que presentaron una respuesta favorable.

La respuesta de estas pruebas y tratamientos fue observada por un periodo de 1 a 30 días, en el cuarto de crecimiento, el cual contó con una temperatura aproximada de 24 °C, una intensidad de luz de 1000 a 3000 lux y un foto período de aproximadamente 16 horas luz y 8 de oscuridad.

#### **B. Unidad experimental**

Cada unidad experimental estaba constituida por un tubo de ensayo de 2 por 15 cm, conteniendo 5 ml de medio nutritivo, y sus respectivas concentraciones de antioxidantes o absorbentes, según el tratamiento al que pertenecía. Así como su respectivo explante el cual consistió en una yema y aproximadamente 1 cm de tallo, esto para el caso de las yemas que han terminado su crecimiento anual, y en el caso de yemas en estado de dormancia, el explante consistió en un ápice de aproximadamente 1 a 2 mm, el cual contenía un meristemo y 2 primordios foliares.

#### **C. Variables de respuesta**

Como variables de respuesta que se evaluaron en esta fase de la investigación se encuentran las siguientes:

- a) Porcentaje de explantes oxidados.
- b) Porcentaje de explantes vivos.

#### **D. Análisis de la información**

La información se analizó utilizando estadística descriptiva, en la cual se describe y comparan los resultados de cada uno de los tratamientos obtenidos durante el transcurso de la investigación e investigaciones previas, lo que nos permitió seleccionar de una forma precisa, el tratamiento y modificaciones pertinentes que indujeron un control sobre los factores que provocan toxicidad, oxidación y muerte de los explantes.

#### **E. Presentación de resultados**

Los resultados obtenidos se reportan detallado los pasos más relevantes sobre el control de las reacciones de los compuestos fenólicos que activan la oxidación y muerte de los explantes.

#### **6.1.4 Fase III: Inducción y crecimiento de brotes y callo**

En esta etapa se utilizó el medio nutritivo “M&S básico modificado” Cuadro 22A, adicionando el absorbente PVP a 0.03% el cual eliminó la muerte de los explantes por oxidación en la fase II.

Los recipientes que se utilizaron fueron tubos de ensayo de 2 por 15 cm, 5 ml de medio sólido, 0.1 ppm de ácido giberélico, así como sus respectivas concentraciones de bencilaminopurina.

## A. Tratamientos

Los reguladores que fueron sujetos a evaluación fueron la citocinina 6-bencilaminopurina en concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm. (Cuadro 9), ya que Murayama, *et al.*, (30), Tetsumura, *et al.*, (40) y Kupter (27), reportan haber tenido resultados satisfactorios en diversas variedades de persimón al utilizar éste regulador como el más apropiado para la inducción y crecimiento de brotes, reportando también una elevada formación de callo.

Cuadro 9: Diferentes concentraciones de Bencilaminopurina evaluadas para la inducción y crecimiento de brotes.

TRATAMIENTOS	Reguladores	
	ppm de GA3 <sup>g</sup>	ppm de BAP <sup>h</sup>
T1 (testigo)	0.1	0.0
T2	0.1	2.0
T3	0.1	4.0
T4	0.1	6.0
T5	0.1	8.0
T6	0.1	10.0

<sup>g</sup> Ácido giberélico (giberelina)

<sup>h</sup> 6-bencilaminopurina (citocinina)

## B. Unidad experimental

Cada unidad experimental estaba constituida por en un tubo de ensayo de 2 por 15 cm, conteniendo 5 ml de medio nutritivo, y sus respectivas combinaciones de reguladores según el tratamiento al que pertenecía. Así como su respectivo explante, el cual consistió en un ápice de aproximadamente 1 a 2 mm de longitud, con dos primordios foliares el cual se obtuvo de yemas apicales y axilares en estado de dormancia (figura 3a).

## C. Variables de respuesta

### a. Formación de callo

El registro de la formación de callo se realizó al momento de realizar el primer y segundo subcultivo, observando las siguientes variables.

- Presencia de callo.
- Color del callo: en esta variable se registró el color del callo formado, el cual fue comparado con la tabla de colores Munsell.
- Textura del callo: en esta variable se tomo en cuenta el tamaño de los pequeños conglomerados de células indiferenciadas, clasificándolas como fina (1 mm), mediana (2 mm) o gruesa (3 mm de diámetro).
- Tamaño del callo: para ello se utilizó la escala de medición que se presenta en el cuadro 10.

Cuadro 10: Escala de medición de las diferentes categorías utilizadas en la medición de tamaño de callos producidos por explante (ápice).

<b>Categoría</b>	<b>Tamaño de callo en mm</b>
Pequeño	0.1 a 1.9 mm
Mediano	2.0 a 2.9 mm
Grande	3.0 a 3.9 mm
Extra-grande	4.0 a 5.0 mm

Fuente: Aspuaca Apxuac JA.

#### **b. Crecimiento de brotes**

- a). Porcentaje de sobrevivencia.
- b). Número de brotes.
- c). Tamaño del brote: para ello se utilizó la escala de medición detalla en el cuadro 11.

Cuadro 11: Escala de medición de las diferentes categorías utilizadas en la medición de tamaño de brotes producidos por explante (ápice).

<b>Categoría</b>	<b>Tamaño de brote en mm</b>
Pequeño	0.2 a 0.9 mm
Mediano	1.0 a 1.9 mm
Grande	2.0 a 2.9 mm
Extra-grande	3.0 a 4.0 mm

Fuente: Aspuaca Apxuac JA.

- d). Calidad del brote: en este caso se observó el No. de nudos y No. de hojas.

#### **D. Análisis de la información**

La información recabada en esta fase de la investigación se analizó utilizando estadística descriptiva debido a la naturaleza de las variables de respuesta que en su mayoría son datos cualitativos. Para ello se describe y compara detallando cada uno de los resultados de las variables evaluadas, y los resultados obtenidos en investigaciones previas.

#### **E. Presentación de resultados**

Los resultados obtenidos se reportan recalcando el tratamiento que indujo un mayor crecimiento de brotes y callos.

#### **6.1.5 Fase IV: Enraizamiento**

Snir (37), indica que frutales como el melocotón y pera, presentaron mayor productividad cuando crecieron con sus propias raíces, que cuando eran injertados. Así mismo menciona que el proceso de enraizamiento en estas especies es difícil, motivo por el cual se debe investigar, ya que cada especie difiere en comportamiento.

Previo a la fase de enraizamiento, se propagó masivamente material vegetal, utilizando el tratamiento que presento mayor crecimiento por explante evaluado en la fase de III. Esto con el propósito de someter a evaluación de enraizamiento materiales con procedencia de concentración de reguladores homogénea y no incurrir en la obtención de resultados alterados por la interacción de las diferentes concentraciones de BAP existentes en los diferentes tratamientos evaluados en la fase III y las concentraciones a evaluar de la fase IV.

En ésta fase IV se utilizó el mismo medio nutritivo “M&S básico modificado” empleado en la fase III, con la salvedad de cambiar la citocinina (BAP) por una auxina, en este caso el ácido indolbutírico (IBA) y/o ácido indolacético (AIA).

Los recipientes que se utilizaron fueron tubos de ensayo de 2 por 15 cm, con 5 ml de medio sólido, 0.1 ppm de GA<sub>3</sub> así como sus respectivos concentraciones de IBA y/o AIA.

#### A. Tratamientos

Los reguladores sujetos a evaluación fueron la auxina ácido indolbutírico (IBA) en concentraciones de 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 2.0 ppm (Cuadro 12), ya que Murayama, *et al.*, (30), reportan haber tenido resultados satisfactorios en persimón variedad Hiratanenashi, la auxina ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y 2.0 ppm las cuales se presentan en el cuadro 12.

Cuadro 12: Diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) y ácido indolacético (AIA) evaluados para la inducción de raíces.

TRATAMIENTOS	Reguladores del crecimiento		
	mg/L de GA <sub>3</sub>	mg/L de IBA	mg/L de AIA
T1 (testigo)	0.1	0.0	0.0
T2	0.1	0.25	0.0
T3	0.1	0.50	0.0
T4	0.1	0.75	0.0
T5	0.1	1.0	0.0
T6	0.1	2.0	0.0
T7	0.1	0.0	0.25
T8	0.1	0.0	0.50
T9	0.1	0.0	0.75
T10	0.1	0.0	1.0
T11	0.1	0.0	2.0

## **B. Unidad experimental**

Cada unidad experimental estaba constituida por en un tubo de ensayo de 2 por 15 cm, conteniendo 5 ml de medio nutritivo, sus respectivas combinaciones de reguladores y un brote de aproximadamente 7 a 10 mm de longitud.

## **C. Variables de respuesta**

Las variables de respuesta que se evaluaron en esta fase de la investigación se recavaron durante el transcurso de los 30 días que duro esta fase. Las variables a estudiar fueron:

- a). Porcentaje de Medios oxidados.
- b). Porcentaje de ennegrecimiento de explantes.
- c). Inducción de raíces: se observó detenidamente cada explante de los tratamientos, para constatar si al menos uno de los tratamientos indujo la formación de raíces.

## **D. Análisis de la información**

La información se analizó utilizando estadística descriptiva, en la cual se describe y compara cada uno de los resultados de los tratamientos y resultados obtenidos en investigaciones previas, lo que nos permitió describir la respuesta a la inducción de raíces.

## **E. Presentación de resultados**

De los resultados obtenidos, se detallan las características más relevantes, adquiridas e inducidas por las diferentes concentraciones de auxinas hacia los explantes, en la inducción y proliferación de raíces.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación, así como lo indica la metodología, están ordenados de una forma secuencial, subdividida en cinco fases: Selección y preparación de la planta madre; Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia; Control de oscurecimiento oxidativo y muerte del explante; Inducción y crecimiento de brotes; y enraizamiento de brotes. De tal forma que los resultados satisfactorios de una fase, luego de ser analizados, permiten continuar con la siguiente fase de la investigación.

### 7.1 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 7.1.1 Fase 0: Selección y preparación de la planta madre

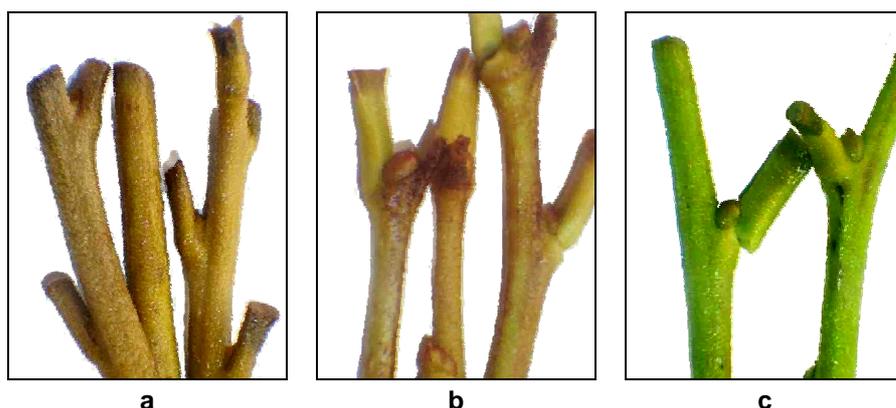
Siguiendo las recomendaciones de FAO (15), la selección de la planta que se utilizó como fuente de obtención de material vegetal, fue determinante, ya que para fines de investigación, la calidad del material es indispensable y tomando en cuenta que al realizar una propagación clonal a mediano o largo plazo, se pretende multiplicar árboles que posean un alto rendimiento, vigorosos, tolerantes a enfermedades, así como tamaño, color de fruto aceptable y atractivo para los diversos mercados existentes de acuerdo con nuestros fines de investigación. El árbol seleccionado para la colecta de explantes contaba con una edad de 8 años, aspecto que FAO (15), coloca especial importancia, ya que el éxito del cultivo de tejidos u órganos en especies maderables, disminuye con el aumento de la edad de la planta, factor que fue determinante para la selección de una planta relativamente joven.

El aislamiento del árbol con plástico de invernadero (figura 2c), tres meses previos a la obtención de explantes, permitió crear un ambiente aislado en lo posible de enfermedades fungosas, conjuntamente con las aspersiones realizadas con fungicidas y rotaciones de diferentes ingredientes activos de los mismos, fueron efectivas en el control de patógenos en dicho árbol, por ende, un control fitosanitario adecuado, con lo cuál se garantizó la procedencia y calidad del material utilizado en dicha investigación.

#### 7.1.2 Fase I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

Aplicando los procedimientos que Lizarra, *et al.*, (28), para garantizar que el material se encuentre libre de contaminantes se procedió al proceso de desinfección, el cual consistió en un lavado con fungicidas, bactericidas y antioxidantes.

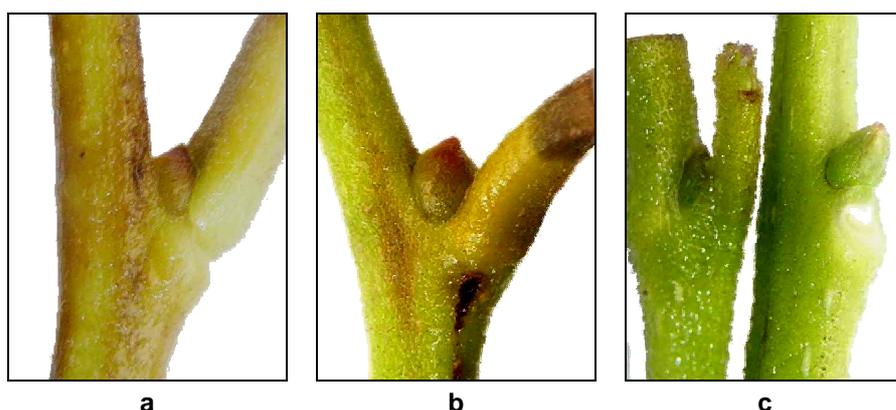
Al observar los resultados obtenidos por la exposición de los explantes en la solución de desinfectantes, utilizando 0.1% de fungicida (bencimidazol-benomyl), bactericida al 0.15% (sulfato de cobre pentahidratado) y ácido cítrico a 0.4%, en tiempos de 3, 6 y 12 horas, se observó que los explantes son susceptibles a daño por intoxicación en tiempos mayores a 3 horas. El daño observado en los explantes, fue básicamente una decoloración de los explantes pasando de un color verde a un color café para el tiempo de 12 horas (figura 5a). Disminuyendo el tiempo a 6 horas el daño fue menos evidente, pero aun presente, pues la decoloración del explante fue de verde a café-claro (figura 5b). El resultado más aceptable se obtuvo al sumergir los explantes por un periodo de 3 horas, donde el material no sufrió ningún indicio de daño en cuanto a cambio de coloración se refiere (figura 5c), por ende ningún daño evidente en la superficie de los explantes.



Fuente: Aspuaca Apxuac, JR. 2003.

Figura 5: Efecto del tiempo de exposición de explantes de persimón a una solución de fungicida, bactericida y antioxidante: **a)** Explantes con un tiempo máximo de 12 horas de exposición a la solución desinfectante, observándose un cambio de color verde a café; **b)** Explantes con 6 horas de exposición a la solución desinfectante, observándose un cambio de color verde a café claro; y **c)** Explantes con 3 horas de exposición a la solución desinfectante, no observándose ningún cambio de coloración.

Para establecer la concentración adecuada de hipoclorito de sodio, se realizaron tres tratamientos, de las cuales, la concentración de 0.50% de hipoclorito de sodio, el 95% de los explantes manifestaron una decoloración (figura 6a), así como un 50% de explantes, presentaron pequeñas porciones de material con una tonalidad café, lo cual es indicio de un acelerado proceso de oxidación de fenoles. Utilizando el mismo procedimiento, con la salvedad de reducir la concentración de hipoclorito de sodio a un 0.40%, la decoloración fue menos severa (figura 6b), pero se manifestó en un 50% del total de explantes. La oxidación también fue evidente, pero deducida a un 20%. Reduciendo la concentración de hipoclorito de sodio a un 0.30%, no se observó cambio de coloración en ningún explante (figura 6c), y los explantes que manifestaban oxidación se redujeron a solo un 1%.



Fuente: Aspuaca Apxuac, JR. 2003.

Figura 6: Efecto de la exposición de los explantes por 5 minutos a las diferentes concentraciones de la solución de hipoclorito de sodio: **a)** Explantes con una concentración de 0.50% de hipoclorito de sodio, observándose una decoloración de verde a amarillo y manchas con una tonalidad café; **b)** Explantes con una concentración de 0.40% de hipoclorito de sodio, observándose una marcada reducción en la decoloración y manchas café; y **c)** Explantes con una concentración de 0.30% de hipoclorito de sodio, observándose un color natural.

Los porcentajes que se mencionan en estos resultados de desinfestación, fueron recabados luego de realizar 5 lavados con agua desmineralizada y autoclaviada, como lo recomienda Lizarra, *et al.*, (28), ya que estos lavados permiten eliminar completamente el desinfestante, debido a que en periodos más prolongados es potencialmente toxico para las plantas.

### 7.1.3 Fase II: Control de oscurecimiento oxidativo y muerte del explante

Las pruebas preliminares, en la siembra de explantes en el medio básico M&S reducido a la mitad de concentración de sales, demostró que la variedad Hachiya es altamente susceptible a la oxidación, ya que el 100% de los explantes murieron durante las primeras 72 horas de incubación. Encinas (13), manifiesta que esta oxidación y ennegrecimiento, esta relacionado con el estado fisiológico, edad, desarrollo y estado fitosanitario, así como la manipulación y esterilización, lo que provocó en mayor o menor medida situaciones de estrés, desecación, daños mecánicos, cambios de pH, cambios en el potencial hídrico, salino y osmótico al ser incubado en el medio de cultivo. Como resultado de estos cambios se provoca la estimulación de compuestos fenólicos produciendo reacciones de hipersensibilidad, en las cuales se produjo la exudación del contenido de las células deterioradas, así como estrés en las células vecinas de las dañadas, las cuales provocaron paulatinamente la muerte de los explantes.

Tomando en cuenta los trabajos y resultados obtenidos por Kupter (27), Murayama, *et al.*, (30) y Tetsumura, *et al.*, (40), fue indispensable evaluar el comportamiento de ésta variedad, ante la presencia de productos antioxidantes. Ziv y Halevy (44) y Sierra, *et al.*, (36), indican que la adición de estas sustancias antioxidantes como el ácido cítrico y L-cisteina, para contrarrestar la muerte de los explantes, es una de las alternativas para eliminar la oxidación de fenoles. Estos productos fueron adicionados directamente al medio de cultivo, pero no se reflejaron los resultados esperados, ya que de los 6 tratamientos evaluados, el 100% de los explantes adquirieron una apariencia similares al testigo, esto se observó al cabo de 3 días después de la siembra (cuadro 13), en donde todos los explantes habían cambiado de verdes a cafés, indicio de muerte de los explantes. Encinas (13), manifiesta que estos antioxidantes se deben utilizar con mucha precaución, ya que tras su oxidación pasan a ser oxidantes muy potentes invirtiendo su efecto positivo en el control de los fenoles.

Cuadro 13: Resultados obtenidos en el control de la oxidación de explantes, 3 días después de la siembra, utilizando antioxidantes como ácido cítrico y L-cisteina (yemas con un centímetro de tallo).

Tratamientos		Explantes oxidados		Explantes vivos	
Código	Antioxidantes (ppm)	Explantes	Porcentajes	Explantes	Porcentajes
T1(testigo)	0	10	100	0	0
	<b>Ácido cítrico</b>				
T2	50	10	100	0	0
T3	100	10	100	0	0
T4	150	10	100	0	0
	<b>L-cisteina</b>				
T5	50	10	100	0	0
T6	100	10	100	0	0
T7	150	10	100	0	0

Observando los resultados al evaluar agentes absorbentes como el carbón activado (CA) y la Polivinylpyrrolidone (PVP), que Sierra, *et al.*, (36), y George (18), indican que los mismos han solucionado los problemas de oxidación en diversas especies de vegetales, se comprueba que ésta especie es bastante susceptible a la oxidación, ya que ninguno de los tratamiento efectuados con carbón activado en concentraciones de 5,000, 10,000, y 15,000 ppm, detuvieron este tipo de reacciones, observándose un 100% de explantes oxidados a los 8 días de incubados, efecto similar al testigo (cuadro 14). En el caso de la polivinylpyrrolidone, el proceso fue retrasado por al menos 9 días, en las seis dosis evaluadas. Siendo el mejor tratamiento que contrarresto la oxidación el T5 el cual contenía 300 ppm de PVP, registrándose únicamente un 10% de explantes oxidados, en comparación al 20% de explantes oxidados observados en cada uno de los tratamiento de 600, 900, 1000, 3000 y 6000 ppm de PVP (cuadro 14). Sin embargo 15 días después de la siembra el porcentaje de sobre vivencia observado fue del 0% para todos los tratamientos.

Cuadro 14: Resultados obtenidos en el control de la oxidación de explantes, 8 y 15 días después de la siembra, utilizando absorbentes como Carbón activado y polivinylpyrrolidone evaluados para contrarrestar la muerte de explantes (yemas con un centímetro de tallo).

Tratamientos		8 días después de la siembra				15 días después de la siembra			
Código	Absorbentes	Explantes oxidados		Explantes vivos		Explantes oxidados		Explantes vivos	
		Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje
T1(testigo)	0	10	100	0	0	10	100	0	0
	<b>Carbón activado (CA) ppm.</b>								
T2	5000	10	100	0	0	10	100	0	0
T3	10000	10	100	0	0	10	100	0	0
T4	15000	10	100	0	0	10	100	0	0
	<b>Polivinylpyrrolidone (PVP) ppm.</b>								
T5	300	1	10	9	90	10	100	0	0
T6	600	2	20	8	80	10	100	0	0
T7	900	2	20	8	80	10	100	0	0
T8	1000	2	20	8	80	10	100	0	0
T9	3000	2	20	8	80	10	100	0	0
T10	6000	2	20	8	80	10	100	0	0

Siguiendo las recomendaciones de George (18), donde describe que otra de las alternativas para eliminar estos procesos de oxidación es la utilización de medios líquidos, utilizando para ello, puentes de papel filtro y eliminado el agente solidificante (agar). Se evaluó el comportamiento de los explantes en el medio líquido M&S a la mitad de concentración de sus sales. Durante los primeros 8 días de incubado, el tratamiento dos, el cual consistió en el medio M&S a la mitad de concentración de sus sales, puentes de papel filtro y 300 ppm de PVP, el 100% de los explantes sobrevivieron, no presentándose ningún síntoma de oxidación. Resultado que fue similar al testigo (T1), en el cual el 100% de los explantes se mantuvieron vivos (cuadro 15). A los 15 días de incubación el testigo ya contaba con un 10% de oxidación. Resultado que demostró que el absorbente PVP en medio líquido con puentes de papel, produjo una respuesta favorable, ya que éste aun contaba con el 100% de sobrevivencia (cuadro 15), sin ningún indicio de oxidación del medio o necrosis del explante.

Cuadro 15: Resultados obtenidos a los 8 y 15 días después de la siembra en el medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), para obtener un medio líquido y para limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo) con el medio nutritivo, utilizando puentes de papel filtro.

Tratamientos		8 días después de la siembra				15 días después de la siembra			
Código	Absorbentes ppm Polivinylpyrrolidone (PVP)	Explantes oxidados		Explantes vivos		Explantes oxidados		Explantes vivos	
		Explante	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje
T1	0	0	0	10	100	1	10	9	90
T2	300	0	0	10	100	0	0	10	100

En el cuadro 16, presentan los datos recabados a los 21 y 30 días después de la incubación. En él observamos el comportamiento de los dos tratamientos a los 21 días, donde el tratamiento con PVP presentaban un 20% de explantes muertos por oxidación, comparado al 30% muertos del testigo, a los 30 días únicamente se contaba con un 50% de sobrevivencia en el tratamiento con 300 ppm de PVP comparado al 30% de sobrevivencia del testigo.

Cuadro 16: Resultados obtenidos a los 21 y 30 días después de la siembra en el medio M&S, eliminando el agente solidificante (agar), en medio líquido, con puente de papel filtro y así, limitar el contacto del explante (yemas con un centímetro de tallo), con el medio nutritivo.

Tratamientos		21 días después de la siembra				30 días después de la siembra			
Código	Absorbentes en porcentaje.	Explantes oxidados		Explantes vivos		Explantes oxidados		Explantes vivos	
		Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje
	Testigo.								
T1	0	3	30	7	70	7	70	3	30
	Polivinylpyrrolidone (PVP)								
T2	0.03	2	20	8	80	5	50	50	50

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, modificando la concentración del medio básico M&S, hace inferir que los explantes de persimón no toleran altas concentraciones de nutrientes proporcionados por el medio M&S. Analizando el cuadro 17 es evidente que al incrementar la concentración del medio de 0% (tratamiento uno) a un 25% (tratamiento dos), el porcentaje de muerte se incrementó de un 50% a un 90% y a concentraciones de 50 > 100% del medio, la muerte de los explantes fue del 100% al cabo de 30 días de sembrado el explante. Al comparar las diversas concentraciones M&S, y las dos dosis de PVP, se determinó que los explantes sobrevivieron un 70% en el tratamiento seis, el cual consistió en agar a 7gr/lit, agua desmineralizada y 300 ppm de PVP. El tratamiento once también presentó el mismo porcentaje de sobrevivencia, seguido por el tratamiento uno con un 50%. Los tres tratamientos mencionados anteriormente contenían 0% de M&S, lo cual pone en evidencia que hay componentes de dicho medio que estaban causando

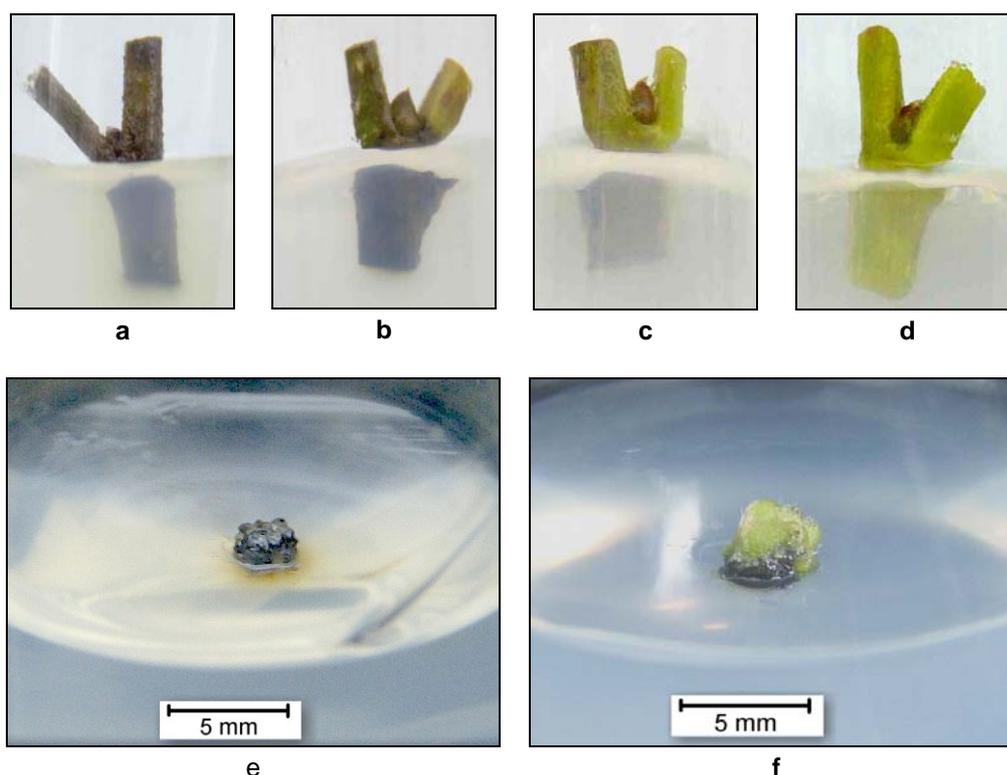
una muerte por toxicidad, causando una oxidación acelerada, hecho que provoco la exudación del contenido de las células deterioradas, así como estrés causado en las células vecinas de las dañadas, las cuales provocaron paulatinamente la muerte de los explantes.

Cuadro 17: Diferentes concentraciones del medio básico y dos dosis diferentes de PVP. Utilizando como explantes yemas con 1 cm de tallo. Resultados recabados 30 días después de la siembra e incubación.

Tratamientos		Polivynylpyrrolidone (PVP) ppm.	Explantes oxidados		Explantes vivos	
Código	M&S (porcentaje)		Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje
T1	0	0	5	50	50	50
T2	25	0	9	90	1	10
T3 (testigo)	50	0	10	100	0	0
T4	75	0	10	100	0	0
T5	100	0	10	100	0	0
T6	0	300	3	30	7	70
T7	25	300	8	80	2	20
T8	50	300	10	100	0	0
T9	75	300	10	100	0	0
T10	100	300	10	100	0	0
T11	0	600	3	30	7	70
T12	25	600	9	90	1	10
T13	50	600	10	100	0	0
T14	75	600	10	100	0	0
T15	100	600	10	100	0	0

Encinas (13) y George (18), en sus investigaciones realizadas, confirman que no todos los cultivos toleran altas concentraciones de los componentes del medio nutritivo. Los resultados que se plasman en el cuadro 17 demuestran y confirman estos conocimientos, los cuales fueron indispensables como punto de partida para la modificación del medio básico M&S.

Se observa claramente la comparación entre las diferentes concentraciones del medio básico M&S en donde a una concentración del 50% (figura 7a), la coloración del explante es indicio de muerte, sin embargo a una concentración del 25% (figura 7b), el explante aun presenta indicios de vida, pero su coloración indica que la muerte aun es evidente, ya que existe mayor área café que verde. El tratamiento que consistió únicamente en sacarosa y agar (figura 7c), el explante no presenta ninguna porción café, pero si una coloración un tanto amarilla, debido a la falta de nutrientes en el medio, y es lógico, sabiendo que únicamente existe una fuente de carbono la cual es la sacarosa. Al comparar el nuevo medio el cual se elaboro de tal forma que proporcione al explante la cantidad adecuada de elementos (Cuadro 22A), se observa que la coloración amarilla desaparece, ya que el color predominante es un verde natural (figura 7d).



Fuente: Aspuaca Axpucac, JR. 2003.

Figura 7: Comparación de diferentes concentraciones del medio M&S y M&S básico modificado, elaborado de acuerdo al rango óptimo de elementos en análisis foliar, y la respuesta de dos tipos de explantes a 30 días después de incubados: **a)** Explante en un medio con el 50% de los nutrientes del M&S básico; **b)** Explante con el 25% de los nutrientes del M&S básico; **c)** Explantes en un medio que contiene sacarosa y agar; **d)** Explante en un medio que contiene los nutrientes del medio "Aspuaca"; **e)** Ápice de yema lateral en un medio con 25% de los nutrientes del M&S básico (tubos de ensayo de 1.5 por 12.5 cm); y **f)** Ápice de yema lateral en un medio que contiene los nutrientes del medio "Aspuaca", (tubos de ensayo de 1.5 por 12.5 cm).

La época de colecta del material y la edad del mismo es un factor que fue sujeto a evaluación, ya que este árbol frutal presenta un crecimiento anual (figura 3), y el periodo en el cual el material es bastante manejable en el sentido de realizar la disección del explante con facilidad, es únicamente de abril a junio (figura 3d). Posteriormente la planta entra en un estado de dormancia (figura 3a), periodo en cual el crecimiento es prácticamente nulo, y la planta lo utiliza como un mecanismo de defensa, en el cual los árboles se deshojan y se liberan así del peligro de desecación cuando el aire está frío y seco, y el suelo helado, además, el ápice del tallo y ramas forman yemas de protección, que están a prueba de agua y de los gases. Según Bidwel (7), éste periodo de dormancia es inducido por los días cortos que de algún modo promueven la síntesis del ácido abscísico (ABA) a través de un sistema mediado por el fitocromo, de hecho durante los días largos el ABA sea producido en las hojas en otoño y se muevan a las ramas. De modo inverso, en la primavera se forman sustancias promotoras del crecimiento (sobre todo  $GA_3$ ) y desaparezca en el otoño y principios de invierno, sin embargo, las horas frío que se acumulan también son un factor importantísimo en el rompimiento de la dormancia.

Durante éste periodo de dormancia se da una lignificación del tallo que hace dificultosa la disección del explante. Esta circunstancia especial, motivó a evaluar el comportamiento de un tipo de explante diferente, el

cual consistió en yemas laterales en estado de dormancia. El explante que se utilizó, fue básicamente el ápice con dos primordios foliares, el tamaño del mismo aproximadamente fue de 2 mm de alto por 1.5 mm de ancho. Al observar la respuesta favorable de este explante en el nuevo medio con 300 ppm de PVP (figura 7f), comparándolo con el M&S al 25% y 300 ppm de PVP (figura 7e), en el cual la muerte fue evidente, observándose el ennegrecimiento del explante y la liberación de compuestos fenólicos en el medio de cultivo. Por otro lado, en el nuevo medio "M&S básico modificado por Aspucaca," se observó que el material, además de contrarrestar la muerte y oxidación del explante, la respuesta al crecimiento demostró ser alentadora, ya que a los 5 días de incubado, en él explante se observó un aumento de tamaño del mismo. Este tipo de respuesta no se observó en las yemas con un centímetro de tallo (figura 7d), ya que durante los 30 días que fueron observados no se registró ningún indicio de crecimiento.

Entre las ventajas que se tienen al utilizar ápices de yemas como explantes, según autores como Hurtado y Merino (22), es la obtención de material sano a partir de meristemos apicales; los estudios más relevantes fueron hechos en papa (Sussex, 1965; Ingram y Robertson, 1965; Accatino, 1966; Gregorini y Lorenzi, 1964; Mellor y Stace-Smith, 1977; Wang, 1977 Solórzano, 1983), chile (Juo, Wahgy chien, 1973), fresa (Bdkengrcn y Muller, 1962), manzano (Elliott 1972; Jones, 1976; Abbot, 1976; Jones y Hopgood, 1979), vid (Barlass y Skene, 1978). Además se sabe que la utilización de explantes como los meristemos, disminuye las reacciones de oxidación de fenoles y por ende la muerte de los explantes.

La respuesta de estas pruebas y tratamientos para determinar los factores que inducen la muerte de los explantes, fue observada en cada tratamiento por un periodo de 1 a 30 días, en el cuarto de crecimiento, el cual contaba con una temperatura promedio de 24 °C, una intensidad de luz de 1000 a 3000 lux y un foto periodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, y sus respectivas normas de asepsia.

#### **7.1.4 Fase III: Inducción y crecimiento de brotes y callo**

En ésta fase al medio "M&S básico modificado" utilizado, se le adicionó 300 ppm de PVP, siendo el absorbente que demostró tener un mayor porcentaje de sobrevivencia. La concentración de agar también fue reducida de 7000 ppm a 6000 ppm, ya que Rodríguez (33), reportó obtener muy buenos resultados reduciendo a esta concentración el agar para cultivo de meristemos en *Castanea sativa* Mill. esto por lo pequeño y delicado del explante, el cual requiere un medio de sostén más suave, además de ayudar y permitir una mayor movilidad de sustancias en el medio, que el explante pueda exudar, como una respuesta de protección o mecanismo de defensa, por el cambio de ambiente que el mismo explante puede sufrir al ser incubado.

##### **A. Formación de callo**

Observando los resultados del cuadro 18 y analizándolos, es evidente que existen resultados similares a los obtenidos en las investigaciones realizadas por Kupter (27), Murayama, *et al.*, (30) y Tetsumura, *et al.*, (40), en los que reportan un crecimiento de callos en la base de los explantes.

Al realizar una comparación entre los diversos tratamientos de 6-bencilaminopurina, se ve que únicamente el tratamiento tres presenta diferencias en cuanto a tamaño de callo producido. Este tratamiento contenía 4 ppm de BAP y 0.1 ppm de GA<sub>3</sub> presenta un 90% de explantes, los cuales se encuentran en la categoría de tamaño

pequeño, comprendido en un rango de 0.1 a 1.9 mm y 10% con un tamaño comprendido entre 2.0 y 2.9 mm encontrándose en la categoría de tamaño mediano. En el resto de los tratamiento T1, T2, T4, T5 y T6 el 100% de los explantes presentaron un crecimiento de callo similar en un rango de 0.1 a 1.9 mm, resultado que los coloca en la categoría de tamaño pequeño.

Cuadro 18: Resultados de formación de callo en persimón var. Hachiya, a los 30 días de incubación. En el medio "M&S básico modificado", 300 ppm de PVP como absorbente para contrarrestar la oxidación y 0.1 ppm de ácido giberélico, así como sus respectivas concentraciones de BAP evaluadas.

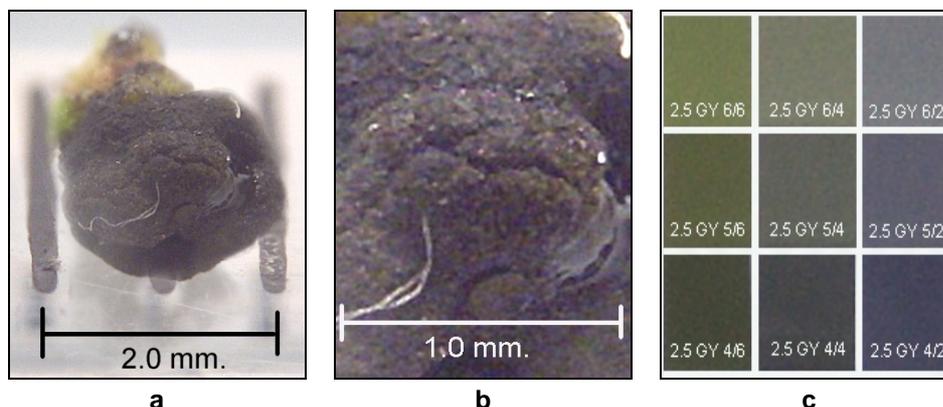
TRATAMIENTOS		FORMACIÓN DE CALLO									
		Explantes vivos (Porcentajes)	Contaminación hongos y/o bacterias (porcentajes)	Calidad de callo				Tamaño de callo			
				Color	Textura			Pequeño	Mediano	Grande	Extra grande
2.5 GY 5/4	Fina (1 mm)				Mediana (2 mm)	Gruesa (3 mm)	0.1 a 1.9 mm				
Código	Bencilaminopurina (ppm)										
T1 testigo	0.0	20	0	100	100	0	0	100	0	0	0
T2	2.0	90	0	100	100	0	0	100	0	0	0
T3	4.0	100	0	100	100	0	0	90	10	0	0
T4	6.0	100	0	100	100	0	0	100	0	0	0
T5	8.0	80	0	100	100	0	0	100	0	0	0
T6	10.0	60	0	100	100	0	0	100	0	0	0

En la figura 8a se observa una fotografía representativa de los tratamientos T1, T2, T4, T5 y T6 en la cual se observa claramente el tamaño del callo, producido en la base de los explantes, inducidos en los diversos tratamientos. Este crecimiento de callo fue equivalente en alto y ancho.

La coloración del callo formado en la base de los explantes, en todos los tratamientos fue similar, observándose estos datos en el cuadro 18. De acuerdo con Munsell Book of Color (29), el color representativo de estos callos es equivalente a 2.5GY 5/4. De acuerdo con Unirioja (41), este código está compuesto por tres dimensiones (H V/C). El tono (H) 2.5GY significa que es un tono localizado entre un color principal como el amarillo y un color intermedio como el verde-amarillo (GY), en el cual predomina más el amarillo que el verde. El valor (V) o claridad, indica la magnitud en una escala de grises partiendo del negro absoluto (0) al blanco absoluto (10) y en nuestro caso que es un (5), el cual indica que se encuentra en un gris medio. Por último, el croma (C), el cual indica el grado de separación entre un tono determinado y un gris de la misma claridad el cual se extiende desde (0) para un gris, hasta (10) ó más, dependiendo de lo saturado que sea el color que se va a evaluar. Que en nuestro caso equivale a una escala de (4). Esta clasificación la podemos observar en la

figura 8c y compararla a la de la figura 8b, donde se observa con lujo de detalle la coloración del conglomerado de células indiferenciadas llamadas comúnmente callo.

En la figura 8b, podemos observar claramente el tamaño de los conglomerados de células indiferenciadas, lo que nos permitió clasificarlas dentro de una textura fina, la cual corresponde para un intervalo de 0.1 a 1.0 mm de diámetro.



Fuente: Aspuaca Apxuac, JR. 2003.

Figura 8: Resultado de los tratamientos T1, T2, T4, T5, y T6 (cuadro 18), a la inducción de brotes y callo; **a)** Explante que muestra el rango de tamaño de callo equivalente en alto y ancho; **b)** Porción de un explante en el cual se observa el color del callo, así como la textura que conforma el conglomerado de células indiferenciadas; y **c)** Colores de la tabla Munsell y su simbología, que permite comparar con el color del callo, adaptado de Munsell Book of Color (29).

## B. Crecimiento de brotes

Amador (3), define al crecimiento como un incremento irreversible en el tamaño que esta comúnmente acompañado por un incremento en peso seco y en la cantidad de protoplasma, que alternativamente puede ser visto como un incremento en volumen o en longitud de una planta y/o parte vegetal. El crecimiento desde un punto de vista más generalizado incluye tanto la división celular como también el agrandamiento celular.

El cultivo de ápices es bien conocido, Curso de cultivo de tejidos (11), Hernández (21) y Usui, *et al.*, (42), concuerdan en que el aspecto más importante es que los ápices pueden regenerar pequeños tallos, los cuales pueden ser luego enraizados, aspecto que obtiene repercusión importante en la propagación vegetal, permitiendo obtener con un elevado índice, plantas genéticamente idénticas a la planta de la cual se originan, además, el cultivo de estas pequeñas porciones del tallo (1-2 mm, el meristemo y dos o tres primordios foliares) constituye parte de una técnica para obtener plantas libres de virus, incluyéndose también a hongos y bacterias. En el cuadro 19 se contempla la contaminación por hongos y/o bacterias, que por el tamaño de explante y trabajando bajo medidas estrictas de asepsia, no se presentó contaminación por éste tipo de microorganismos en ninguna de las unidades experimentales.

Para las variables relacionadas con el crecimiento de brotes, en el cuadro 19, observamos los resultados que se recopilaron a los 30 días de incubación.

Cuadro 19: Resultados obtenidos 30 días después de la incubación de ápices en el cuarto de crecimiento. Anotándose el % de explantes vivos; % de contaminación por hongos y/o bacterias; Tamaño promedio del explante; Calidad de brote y numero de brotes en promedio.

CRECIMIENTO DE BROTES									
TRATAMIENTOS	Explantes vivos (Porcentaje)	Contaminación hongos y/o bacterias (Porcentaje)	Tamaño del explante				Calidad del brote		Número de brotes (promedio)
			Pequeño 0.2 a 0.9 mm (Promedio)	Mediano 1.0 a 1.9 mm (Promedio)	Grande 2.0 a 2.9 mm (Promedio)	Extra Grande 3.0 a 4 mm (Promedio)	No. de nudos (promedio)	No. de hojas (promedio)	
T1 testigo	20	0	0.9	1.1	-	-	2.5	0	1
T2	90	0	0.7	1.41	2.9	-	2	0	1
T3	100	0	-	1.38	2.24	4.2	3	0	1
T4	100	0	-	1.8	2.46	3.2	5.6	0	1
T5	80	0	-	1.49	2	-	4.25	0	1
T6	60	0	0.8	1.5	2	-	5.16	0	1

En la figura 9 se presentan datos, que al analizarlos es evidente que la concentración en la adición de este regulador es fundamental y crítica. Uno de los factores que intervinieron fue la edad y época de colecta del explante, ya que el explante colectado y utilizado provino de la planta que ya había entrado en su periodo de dormancia y por ende la planta ya no presentaba ningún crecimiento activo. Amador (2) y Euita (14), manifiestan que entre las acciones que las citocininas producen se encuentra la eliminación de la dormancia que presentan las yemas de algunas especies, además, estimulan la división celular y morfogénesis provocando el crecimiento de callos y estimulación de la formación de yemas laterales contrarrestando la dominancia apical, así mismo estimulan la expansión foliar debido al alargamiento celular, participan en la proliferación de brotes axilares, formación de yemas adventicias de brotes y la inhibición de formación de raíz.

Los tratamientos tres y cuatro (figura 9), fueron los que presentaron una sobrevivencia del 100%, indicando que a las concentraciones de 4 y 6 ppm de BAP son respectivamente las que eliminan de mejor forma la dormancia e induce la reanudación del crecimiento que presentan dichos meristemos. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Murayama, *et al.*, (30), al propagar persimón variedad Hiratanenashi en la cual observó que al adicionar 5 ppm de BAP, obtuvo 0% de muerte de explantes, 0% de dormancia y un promedio de 1.8 brotes por explante.

El tratamiento dos presentó un 90% de sobrevivencia con una concentración de 2 ppm de BAP. Murayama, *et al.*, (30), con ésta misma concentración de regulador, obtuvo un 20% de mortalidad, un 65% de explantes con dormancia y un crecimiento de un brote por explante; sin embargo con una concentración de 1 ppm del mismo regulador la muerte de los explantes fue de un 70%, con un 100% de explantes que presentaban dormancia; el tratamiento cinco con una concentración de 8 ppm de BAP se obtuvo un 80% de sobrevivencia, con 10 ppm de BAP (tratamiento 6) se obtuvo un 60% de explantes vivos, mientras el testigo (0 ppm de BAP) únicamente presentó un 20% de sobrevivencia, echo que puede atribuírsele a la concentración utilizada de 0.1 ppm de AG<sub>3</sub>. La muerte de estos explantes fue observada por un cambio de color verde a un

color café claro, sin presentarse ningún síntoma de oxidación o ennegrecimiento. Esta muerte se presentó dentro de los primeros 7 días de sembrados en los medios de cultivos.

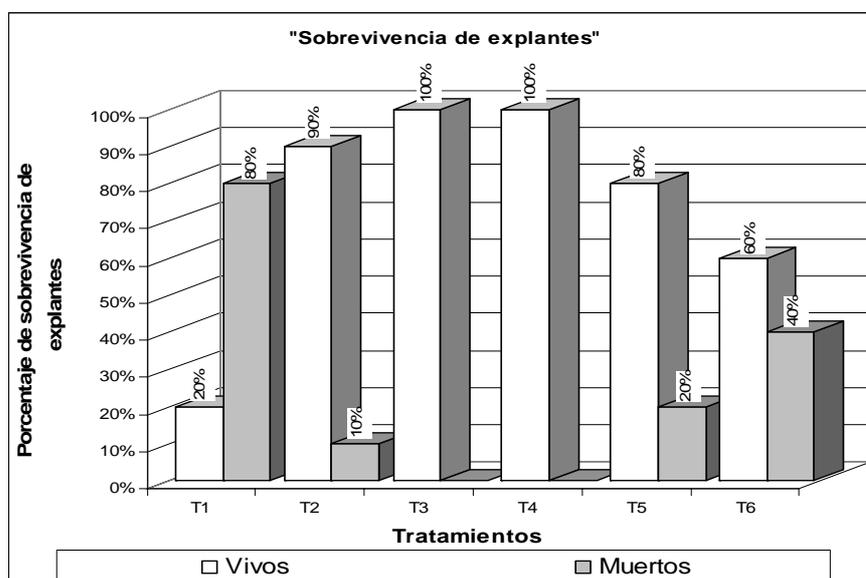


Figura 9: Comportamiento de sobrevivencia de explantes a los 30 días, evaluando 6 concentraciones diferentes del regulador 6-bencilaminopurina y su interacción con 0.1 ppm de  $AG_3$ .

Lo referente a la variable tamaño del explante, en la figura 10, se observa que el tratamiento que presentó mayor crecimiento del brote fue el tratamiento cuatro (6 ppm de BAP y 0.1 ppm de  $AG_3$ ), obteniéndose un 20% de explantes extra grandes, con un tamaño entre 3.0 y 4.0 mm; un 70% de explantes grandes, con un tamaño comprendido entre 2.0 a 2.9 mm; y un 10% de explantes medianos, con un tamaño entre 1.0 y 1.9 mm.

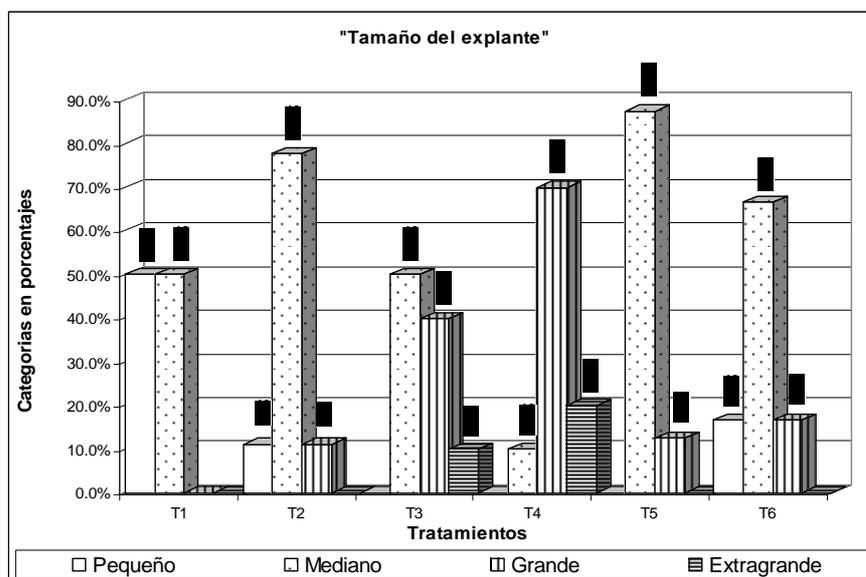
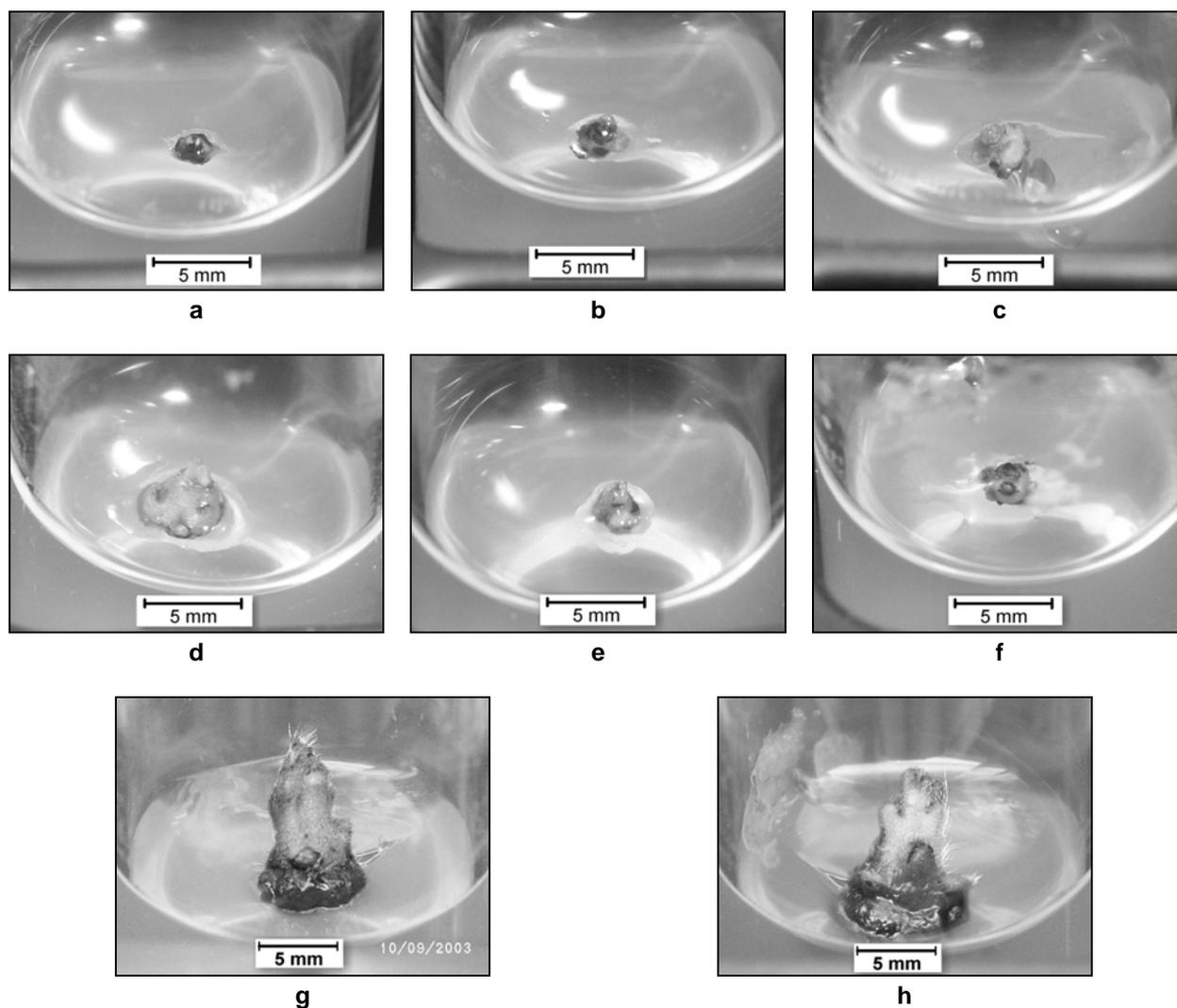


Figura 10: Comparación de 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm y 10 ppm de BAP y 0.1 ppm de  $AG_3$  en la inducción de crecimiento de explantes, agrupándolos en las categorías de Pequeño (0.2 a 0.9 mm), Mediano (1.0 a 1.9 mm), Grande (2.0 a 2.9 mm) y Extragrande (3.0 a 4.0 mm) expresada en porcentajes del total de explantes vivos por tratamiento.

Comparado el tratamiento cuadro con el testigo que no contenía la citocinina BAP en el medio de cultivo si no únicamente 0.1 ppm de  $AG_3$ , el cual presento en sus explante vivos, un 50% de crecimiento mediano y el otro 50% con un crecimiento pequeño. Es evidente que el BAP promueve e induce el crecimiento de los brotes. Y la concentración en la cual se obtuvo un resultado de mayor crecimiento es la de 6 ppm de BAP.

En la figura 11 se compara cada uno de los seis tratamientos, en donde se puede observar el comportamiento de los explantes (ápices) ante la presencia de la citocinina BAP, la cual en la concentración de 6 ppm (figura 11d), presento el mayor crecimiento, comparándolo al testigo (figura 11a).



Fuente. Aspuaca Axpuc, JR. 2003.

Figura 11: Respuesta a las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina en la inducción y crecimiento de brotes: **a)** Tratamiento uno, con 0 ppm BAP (testigo); **b)** Tratamiento dos, con 2 ppm de BAP; **c)** Tratamiento tres, con 4 ppm de BAP; **d)** Tratamiento cuatro, con 6 ppm de BAP; **e)** Tratamiento cinco, con 8 ppm de BAP; **f)** Tratamiento seis, con 10 ppm de BAP; **g y h)** Explantes, 70 días después de la siembra y 4 transferencias en el tratamiento cuatro, con 6 ppm de BAP y 0.1 ppm de  $AG_3$ .

Amador (3), indica que la adición de  $AG_3$  en ciertas plantas produce una gran elongación de los tallos, además de actuar inhibiendo la dormancia de yemas vegetativas. En cultivo de meristemas cuando es utilizado

para estimular el crecimiento de meristemas o ápices de brotes, el ácido giberélico puede prevenir formación de raíces. El mismo autor comenta sobre la integridad apical, en donde los tratamientos con citocininas utilizados para promover la proliferación de brotes axilares, con más de un meristemo apical, el ácido giberélico puede ayudar a preservar la integridad de yemas apicales durante el cultivo.

En la figura 11g y 11h, se observa la interacción giberelina/citocinina, en la cual se conserva la integridad apical, ya que a los 70 días de incubación en el medio "M&S básico modificado" complementado con 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y 6 ppm de BAP, han inducido el crecimiento de los explantes a un tamaño promedio de un centímetro, y un 93.4% de explantes sin crecimiento de brotes.

Cabe mencionar la interacción que la auxina sintetizada por el punto meristemático de dicho explante, pudo intervenir en dichos resultados. Salisbury y Roos (35), menciona que las auxinas se sintetizan principalmente en los ápices de tallos, de donde migra a la zona de elongación y a otras partes donde ejercerá su acción, movilizándose en sentido basipétalo, es decir desde el ápice hasta la base, esto en el caso de los meristemas.

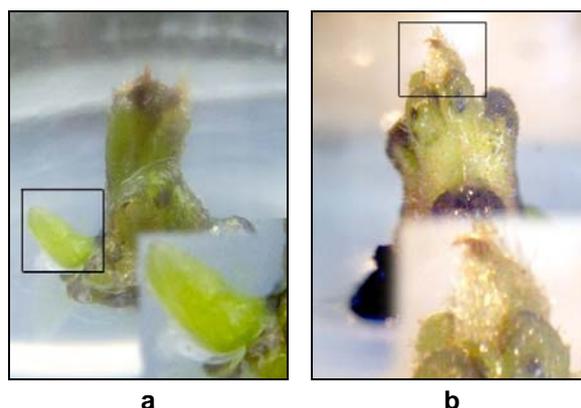
Con la variable número de brotes (cuadro 19), al menos durante los primeros 30 días que duro la fase de inducción de crecimiento de brotes y formación de callo, no se reporto ningún indicio de formación de brotes axilares o embriogénicos. Si no todo lo contrario, únicamente se observó el crecimiento del ápice, siendo el único brote existente por unidad experimental.

Con la variable calidad del brote, la cual se subdividió en número de nudos y número de hojas, el tratamiento que presento el mayor número de nudos fue el tratamiento cuatro (6 ppm de BAP), con un promedio de 5.6 nudos; siguiéndole el tratamiento seis (10 ppm de BAP) con un promedio de 5.16 nudos, comparado con el testigo en el cual únicamente se observo un promedio 2.5 nudos. La distancia entre cada nudo de todos los tratamientos, fue directamente proporcional al tamaño del explante.

De los explantes que sobrevivieron a la fase III, se transfirieron a un nuevo medio, el cual contenía los nutrientes del medio "M&S básico modificado" utilizado en dicha fase, así como los reguladores del tratamiento cuatro, el cual contenía 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y 6 ppm de BAP. A los 40 días de haber realizado dicha transferencia, el 6.6% presentaba al menos un brote axilar como lo demuestra la figura 12a.

Con lo que respecta al número de hojas, no se obtuvo crecimiento de hojas en ninguno de los 6 tratamientos a 30 días que duro la fase III (figuras 11a, 11b, 11c, 11d, 11e y 11f), debido a que al explante que se sembró, se le eliminaron la mayor parte de todos los primordios foliares, dejando únicamente los dos más jóvenes, los cuales rodean la cúpula del meristemo apical, esto con el fin de no dañar ha dicho meristemo.

A los 70 días de cultivo transferidos en el tratamiento cuatro, se observo un pequeño incremento en el crecimiento de los primordios foliares del ápice, como se muestra en la figura 12b.



Fuente: Aspuaca Axpuc, JR. 2003.

Figura 12: Explantes cultivados en el medio “M&S básico modificado” en base a rango óptimo de nutrientes requeridos por el cultivo de persimón, complementado con 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y 6 ppm de BAP con un promedio de 70 días de cultivo: **a)** crecimiento de brote axilar; y **b)** Crecimiento de primordios foliares en cultivo de ápices de persimón var. Hachiya.

#### 7.1.5 Fase IV: Enraizamiento

En la fase de enraizamiento, se propago masivamente ápices de Persimón Var. Hachiya, utilizando el tratamiento cuatro (6 ppm de BAP, 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y 300 ppm de PVP), que presentó el mayor crecimiento de brote en los explantes evaluados en la fase III. Estos explantes fueron subcultivados por un periodo de 70 días, realizando transferencias a cada 20 días. Al momento de realizar la transferencia, los explantes fueron lavados en agua desmineralizada con la ayuda de un pincel y pinzas previamente esterilizadas, esto con el propósito de eliminar el medio que pudo quedar impregnado, así como también para eliminar los compuestos fenólicos que se pudieron sintetizar y diluir en dicho medio. Disminuyendo de esta manera la oxidación y muerte de los explantes.

En el cuadro 20, se observa el comportamiento de los explantes ante la presencia 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y de los reguladores sujetos a evaluación, como la auxina ácido indolbutírico (IBA) y la auxina ácido indolacético (AIA). En ninguno de los tratamientos se observó un crecimiento de raíces.

De los once tratamientos evaluados en la inducción y proliferación de raíces, el testigo (T1), a pesar de no existir formación de raíces, los explantes únicamente presentaron un 10% de medios oxidados y un 20% de explantes necróticos; siguiéndole el tratamiento siete (0.25 ppm AIA), el cual presento un 80% de medios oxidados y un 100% de explantes necróticos; Los tratamientos dos (0.25 ppm AIA), tres (0.50 ppm AIA), cuatro (0.75 ppm AIA) y ocho (0.50 ppm IBA), la oxidación de los medios se incremento a un 80% y la necrosis de los explantes fue de un 100%; Los tratamientos cinco (1.0 ppm AIA), seis (2.0 ppm AIA), nueve (0.75 ppm IBA), diez (1.0 ppm IBA) y once (2.0 ppm IBA), la oxidación de los medios y necrosis de los explantes fue de un 100% comparados con el testigo.

En las figuras 13 y 14, se muestra el comportamiento de explantes de persimón, incubados por un período de 30 días en el medio “M&S básico modificado” y sus respectivas combinaciones de reguladores, de los cuales ninguno de los once tratamientos presentó resultados satisfactorios en la inducción y proliferación de raíces. Sin embargo la tendencia de los tratamientos es que al incrementarse las concentraciones de los

reguladores, la oxidación de los medios tiende a ser más marcada y los explantes adquirieron una tonalidad necrótica.

Cuadro 20: Comportamiento de resultados obtenidos a los 30 días en la inducción de raíces, evaluado cinco dosis de AIA y cinco de IBA.

Tratamientos.		Porcentajes de oxidación y ennegrecimiento.				Inducción de raíces.			
		Medios oxidados.		Ennegrecimiento de explantes.		Raíz primaria.		Raíz secundaria.	
Código	Reguladores de crecimiento. (ppm)	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje	Explantes	Porcentaje
T1 (testigo)	0	1	10	2	20	0	0	0	0
	(AIA)								
T2	0.25	9	90	10	100	0	0	0	0
T3	0.50	9	90	10	100	0	0	0	0
T4	0.75	9	90	10	100	0	0	0	0
T5	1.0	10	100	10	100	0	0	0	0
T6	2.0	10	100	10	100	0	0	0	0
	(IBA)								
T7	0.25	8	80	10	100	0	0	0	0
T8	0.50	9	90	10	100	0	0	0	0
T9	0.75	10	100	10	100	0	0	0	0
T10	1.0	10	100	10	100	0	0	0	0
T11	2.0	10	100	10	100	0	0	0	0

Standard y Romani (38), mencionan que en varias especies de árboles, el enraizamiento sigue siendo uno de los pasos más críticos de la técnica de micropropagación, debido a que en sus resultados al evaluar "Los efectos de algunos antioxidantes en el enraizamiento *in vitro* de retoños de Manzana," observo que al utilizar antioxidantes o absorbentes, en la fase de enraizamiento disminuyó considerablemente los porcentajes de enraizamiento. Esto indica que se deben evaluar diferentes concentraciones de antioxidantes o absorbentes en la fase IV de enraizamiento, para contrarrestar la oxidación del medio y necrosis de los explantes, promoviendo de ésta manera el enraizamiento de los mismos.

El crecimiento de los explantes en ésta fase de la investigación para los tratamientos con auxinas fue básicamente un incremento en el tamaño de células indiferenciadas a las cuales se les denominan callos y en cuanto al tamaño del explante, éste prácticamente fue detenido. Pero al compararlo con el testigo, se observó que el crecimiento fue básicamente en el brote, ya que el crecimiento de la porción de callo fue nulo, lo cual es lógico ya que únicamente contenía ácido giberélico el cual actuó en la elongación del explante.

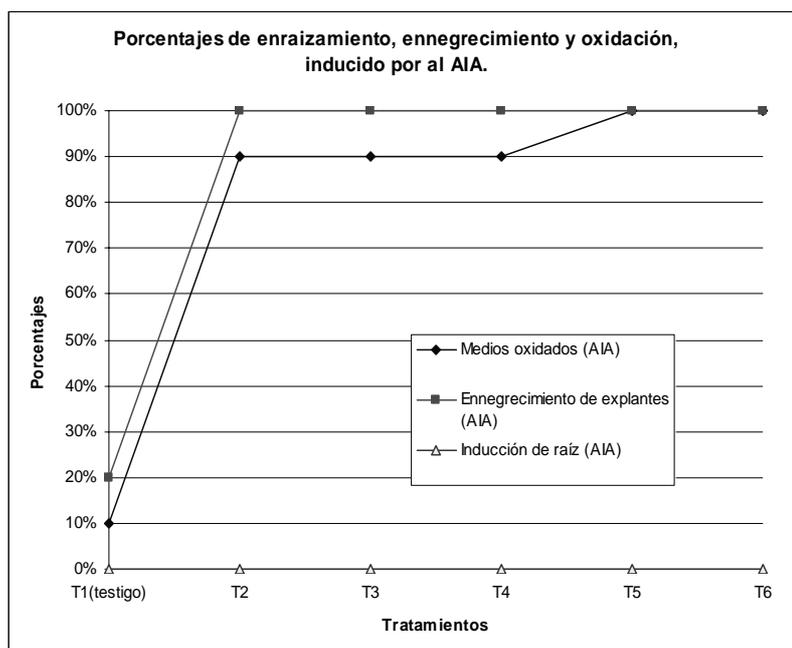


Figura 13: Porcentajes de enraizamiento, ennegrecimiento y oxidación en explantes de persimón ante la presencia de la auxinas ácido indolacético (AIA), en concentraciones de 0.0 ppm AIA (T1), 0.25 ppm AIA (T2), 0.50 ppm AIA (T3), 0.75 ppm AIA (T4), 1.0 ppm AIA (T5) y 2.0 ppm AIA (T6).

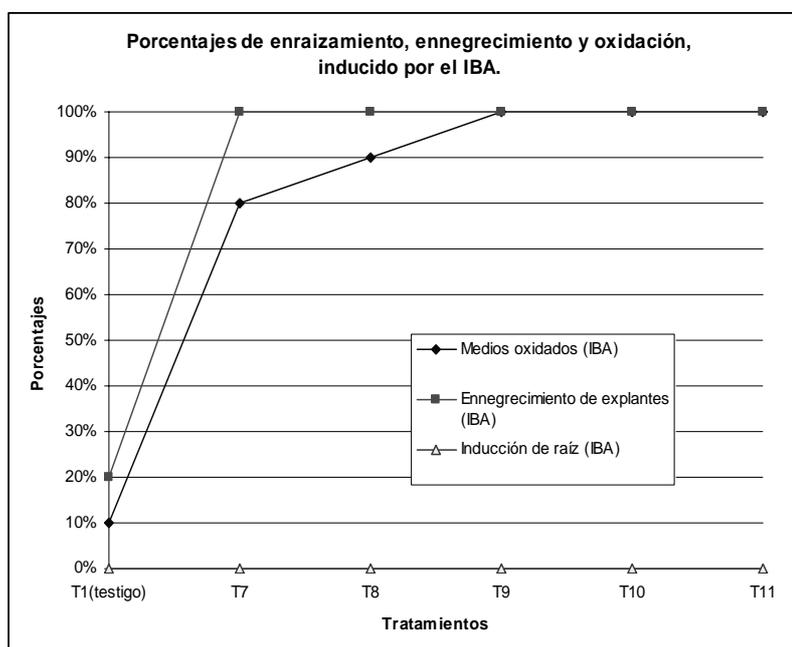


Figura 14: Porcentajes de enraizamiento, ennegrecimiento y oxidación en explantes de persimón ante la presencia de la auxinas ácido indolbutírico (IBA), en concentraciones de 0.0 ppm IBA (T1), 0.25 ppm IBA (T7), 0.50 ppm IBA (T8), 0.75 ppm IBA (T9), 1.0 ppm IBA (T10) y 2.0 ppm IBA (T11).

## 8. CONCLUSIONES

- Para la desinfestación de los explantes se deberán dejar reposar en una solución de desinfestantes de fungicidas (bencimidazol-benomyl al 0.1%), bactericida (sulfato de cobre pentahidratado al 0.15%) y ácido cítrico a 0.4%, por un periodo no mayor a tres horas.
- La concentración de hipoclorito de sodio a utilizar en el proceso de desinfección bajo condiciones de asepsia deberá ser a 0.30% por un periodo de 5 minutos, ya que si los explantes se exponen a concentraciones mayores de hipoclorito de sodio se provocan daños al explante
- Para controlar el oscurecimiento oxidativo y muerte de los explantes por la liberación y oxidación de compuestos fenólicos en la fase de inducción y crecimiento de brotes, se debe de utilizar el medio "M&S básico modificado" (Cuadro 22A), complementado con 300 ppm del absorbente Polivinylpyrrolidone (PVP). Así como realizar transferencias a cada 20 días. Al realizar estas transferencias se deberán lavar los explantes con agua desmineralizada y esterilizada, removiendo cuidadosamente los restos del medio anterior, con la ayuda de un pincel previamente esterilizado, esto con el fin de minimizar el contenido de fenoles oxidados en el medio nutritivo.
- Para la inducción y crecimiento de ápice y callo, se deberá utilizar el medios "M&S básico modificado" (Cuadro 22A), complementado con 300 ppm de PVP, 0.1 ppm de AG<sub>3</sub> y 6.0 ppm de 6-bencilaminopurina, utilizando como explantes iniciales ápices con dos o tres primordios foliares. Dichos explantes deberán tener un tamaño de 1.0 a 2.0 mm en promedio.
- En la fase de enraizamiento de brotes, en ninguna de las concentraciones, evaluando las auxinas ácido indolacético y ácido indolbutírico se observó la inducción de raíces, esto debido al alto porcentaje de formación de fenoles, oxidación del medio nutritivo y muerte de los explantes, la cual fue más evidente al incrementarse la concentración de las auxinas en el medio nutritivo.

## 9. RECOMENDACIONES

- Evaluar el crecimiento de explantes en el cultivo de ápices en estado de dormancia, de persimón Var. Hachiya, utilizando un rango de 5 a 7 ppm de 6-bencilaminopurina, con el fin de determinar la dosis óptima para la inducción y crecimiento de brotes.
- Se sugiere evaluar el comportamiento de brotes, en un rango de 100 a 10,000 ppm de polivinylpyrrolidone en la fase de enraizamiento, para contrarrestar la oxidación, necrosis y muerte de los explantes causada por la formación de compuestos fenólicos.
- Para obtener resultados satisfactorios en la fase de enraizamiento de brotes se sugiere evaluar la respuesta de Persimón Var. Hachiya, ante la presencia de ANA para la inducción de raíces. Así como también se sugiere evaluar otras alternativas como la respuesta al sumergimiento de la base de explantes, por unos segundos, en AIA ó IBA en altas concentraciones e incubarlos en el medio "M&S básico modificado" sin la presencia de reguladores bajo condiciones de oscuridad.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. AGEXPRONT (Asociación Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales, GT). 2000. Manual del cultivo de persimón. Guatemala. 41 p.
2. Amador, D. 1999. Manual de laboratorio: curso de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 33 p.
3. Amador, D. 1999. Reguladores del crecimiento utilizados en cultivo de tejidos vegetales: curso de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 33 p.
4. Arena, ME; Martínez Pastur G. s.f. El cultivo *in vitro* en la propagación de las plantas (en línea). Consultado 24 sep. 2002. Disponible en <http://www.tierradelfuego.org.ar/cadic/proveg.html>.
5. Azpeitia Morales, A; Zapata Altamirano, RJ; Nava, Cedillo, A. 1993. Propagación *in vitro* de durazno, *Prunus persica* (L) Batsch a partir de yemas axilares. Agricultura Técnica 19(1):37-51.
6. Benitez Coronado, J. s.f. Potencialidades agronómicas y económicas de la producción de persimón en Guatemala. Agricultura 3(30):30-32.
7. Bidwell, RGS. 1990. Fisiología vegetal. México, AGT Editor. 784 p.
8. Cabrera Morales, A. 2003. Efecto de antioxidantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón *Prunus persica* (L.) Batsch var. Salcajá. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 85 p.
9. Calderón Estrada, JR. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Var. Guatemalensis cv. Hass y var. América cv. Booth-8 al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 69 p.
10. Cruz Mus, ER. 1999. Caracterización del cultivo de persimón *Diospyros kaki* L. en el departamento de Alta Verapaz. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 86 p.
11. Curso de cultivo de tejidos. (2., 1987, Costa Rica). Programa cooperativo regional para la protección y modernización de la caficultura Centroamérica, Panamá, México y República Dominicana. Memoria. Turrialba, Costa Rica, CATIE-IICA. 124 p.
12. Doods John, H; Roberts Lorin W. 1982. Experiments in plant tissue culture (en línea). New York, US, Cambridge University Press. Consultado 13 set. 2002. Disponible en <http://www.gro.items.mx/servicios-int/bioingenieria/Introducción.html>.
13. Encinas López, C. sf. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas *in vitro* (en línea) estación experimental la Mayora CSIC. Consultado 24 set. 2002. Disponible en <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/encuentros26/26reacciones.html>.
14. Euita. ES. s.f. Fitoreguladores parte III tema 14 (en línea). España, Universidad Politécnica de Valencia. Consultado 16 may. 2003. Disponible en <http://www.euita.upv.es/variados/biologia/temas/tema14.htm>.
15. FAO IT. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Rosell, CV. y Villalobos, VM. 113 p.
16. Fuchsiarana. s.f. Síntoma de deficiencia de fertilizantes (en línea). Consultado 9 feb. 2004. Disponible en <http://fuchsiarana.com/index.htm?http://fuchsiarana.com/deficiencias.htm&1>.
17. Gardner, RV; Bradford, CF; Hooker, DH. 1952. The fundament of fruit production. 3 ed. New York, US, Mc-GrawHill. 740 p.
18. George, EF. 1995. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. US, Et Eseties. 1574 p.
19. Glosario multilingüe sobre recursos genéticos forestales (en línea). 2001?. Austria. Consultado 23 set. 2002. Disponible en <http://iufro.boku.ac.at/iufro/silvavoc/glossary/243es.htm>.
20. Hartman, HT; Kester, DE. 1978. Propagación de plantas. 2 ed. México. Preantice-Hall. p. 644-647.
21. Hernández Tecu, MA. 2000. Respuesta de la planta medicinal zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Calioti al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 71 p.
22. Hurtado, MV; Merino, ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.

23. Infoagro, ES. 2002. El cultivo del persimón (en línea). España. Consultado 13 set. 2002. Disponible en <http://www.infoagro.com/frutas/frutastropicales/caqui.htm>.
24. International Potash Institute, UK. 1980. Physiological aspects of crop productivity; the endogenous hormonal pattern and its interference by exogenous plant growth regulators. Bruinsma, J. 247 p.
25. Itesm (Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, MX). 2002?. Técnica de desinfección para explantes (en línea). Santiago de Querétaro, México, Centro de Bioingeniería Campus Querétaro. Consultado 13 set. 2002. Disponible en <http://www.gro.items.mx/servicios-int/bioingenieria/desinfestacion-explantes.htm>.
26. Jones, SB. 1987. Sistemática vegetal. 2 ed. Trad. por María de Lourdes Huesca Tapia. México, McGraw-Hill. 512 p.
27. Kupter, J. 2002. *In vitro* etablierung von *Diospyros Kaki* mit besonderer frostresistenz (en línea). HBLVA für Gartenbau, Wien-Schönbrunn (Horticultural College and Research Institutes). Consultado 24 set. 2002. Disponible en <http://www.hblgart.bmlf.gv.at/de/va/invitro/diospyros.html>.
28. Lizarra, R; Panta, A; Jayasinghe, U; Dodds, J. 1991. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos: guía de investigación CIP 3. Perú, Centro Internacional de la Papa. 21 p.
29. Munsell book of color. 1976. Glosario finish collection. 2.5 bg-10rp. Baltimore, Maryland, US, Macbeth a Division of Kollmorgen Corporation s.p.
30. Murayama, H; Sugiura, A; Tao, R; Tomana, T. 1986. *In vitro* propagation of japanese persimmon. HortScience 21(5):1205-1207.
31. Oirsa, SV. 2000?. Procesos biotecnológicos para la multiplicación acelerada de plantas y mejoramiento genético de cítricos. multiplicación acelerada de cítricos bajo condiciones de cultivo *in vitro* (en línea). El Salvador. Consultado 13 set. 2002. Disponible en: <http://nsl.oirsa.org.sv/Di05/Di0510/Di051016/5-procesos.htm>.
32. Rincondelvago, ES. 2003?. La célula vegetal (en línea). España, Salamanca. Consultado 9 feb. 2004. Disponible en <http://html.rincondelvago.com/citologia.html>.
33. Rodríguez, R. 1982. *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. Through meristem-tip culture. HortScience 17(6):888-889.
34. Rosenberg, J; Epstein, L. 1995. Química general. 7 ed. Trad. Alicia Larena. México, McGraw-Hill. 422 p. (Serie Schaun).
35. Salisbury, BF; Roos, WC. 1994. Fisiología vegetal. Trad. Gonzáles Velásquez. México, Iberoamérica. 759 p.
36. Sierra, SL de; Moreno, LA de; Vilorio, Z. 1997. Efecto de la oxidación solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo *Psidium guajava* L. (en línea). Consultado 24 set. 2002. Disponible en <http://www.redpav.fpolar.info.ve/fagroluz/v141/v141z005.ntml>.
37. Snir I. 1984. *In vitro* propagation of *Camino apricot*. HortScience 19(2):229-230.
38. Standari, A; Romani, F. 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of Apple shoots. HortScience 25(11):1435-1436.
39. Standley, PC; Williams, LO. 1966. Flora of Guatemala. Myrsinaceae. Chicago, US, Chicago Natural History Museum. v. 24, pt. 8, n 1 y 2, 236 p.
40. Tetsumura, T; Tao, R; Sugiera, A. s.f. Effect of cytokinin types on the *in vitro* propagation of japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) (en línea). Trad. Daisuke Forusawa. Japón. Consultado 16 may. 2003. Disponible en <http://www.kazusa.or.jp/ja/plant/jspcmb/Plantbiotech/PBcontentas/PB8-3.html>.
41. Unirioja. ES. 2003?. Atlas de colores. Sistema Munsell. (en línea). Consultado 20 may. 2004. Disponible en <http://www.unirioja.es/dptos/dq/fa/color/capitulo01.pdf>
42. Usui, K; Okabe K; Victores, R; Ramírez, E. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, GT / Voluntarios Japoneses en la Cooperación Técnica con el Extranjero. 166 p.

43. Vásquez, FJ; Carrillo, JE; Mejía, L. 1991. La biotecnología y su aplicación en la agricultura guatemalteca. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, GT / USAC, Facultad de Agronomía. 27 p.
44. Ziv, M; Halevy, AH. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. HortScience 18(4):434-436.

## 11. APÉNDICE

Cuadro 21A: Proporción de nutrientes utilizados en el Medio básico de Murashige y Skoog (1962).

Reactivos Químicos	Cantidad ppm
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
NaFe-EDTA	37.26
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.6
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Mio-inositol	100

Fuente: Tomado de Hartman y Kester (20).

Cuadro 22A: Medio "M&S básico modificado", basado en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2) y cálculos descritos en Cuadro 23A.

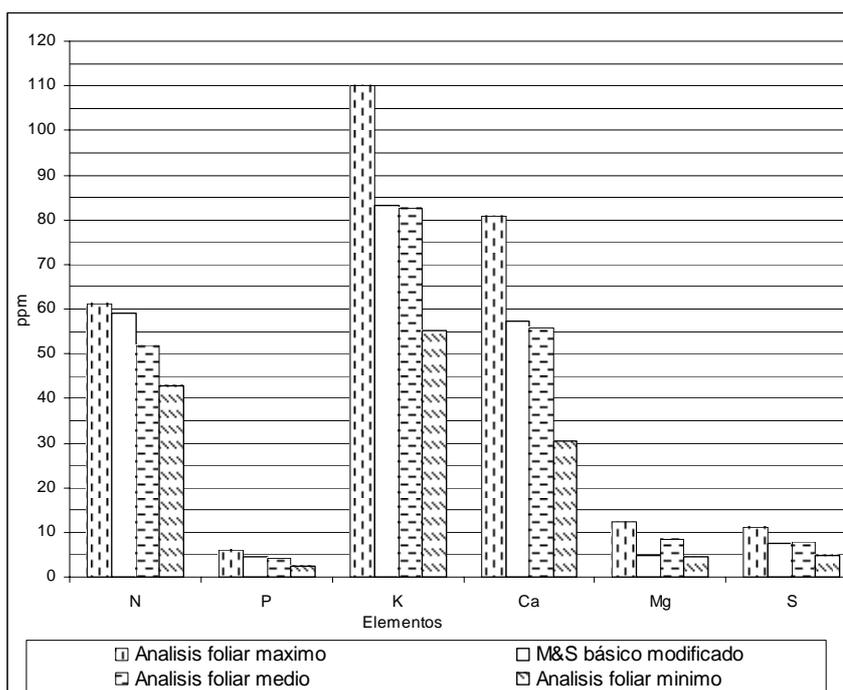
Reactivos Químicos	Cantidad ppm
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	90
KNO <sub>3</sub>	200
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	210
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.250
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.001
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.450
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5.0
Na <sub>2</sub> .EDTA	2.681
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Mio-inositol	100
Agar	6,000
Sacarosa	30,000
pH =5.7	

Fuente: Aspuaca Apxuac, José Raúl, 2003.

Cuadro 23A: Cálculos efectuados para determinar los gramos de compuestos requeridos para un litro de medio "M&amp;S básico modificado", así como los gramos requeridos en la solución patrón de dicho medio.

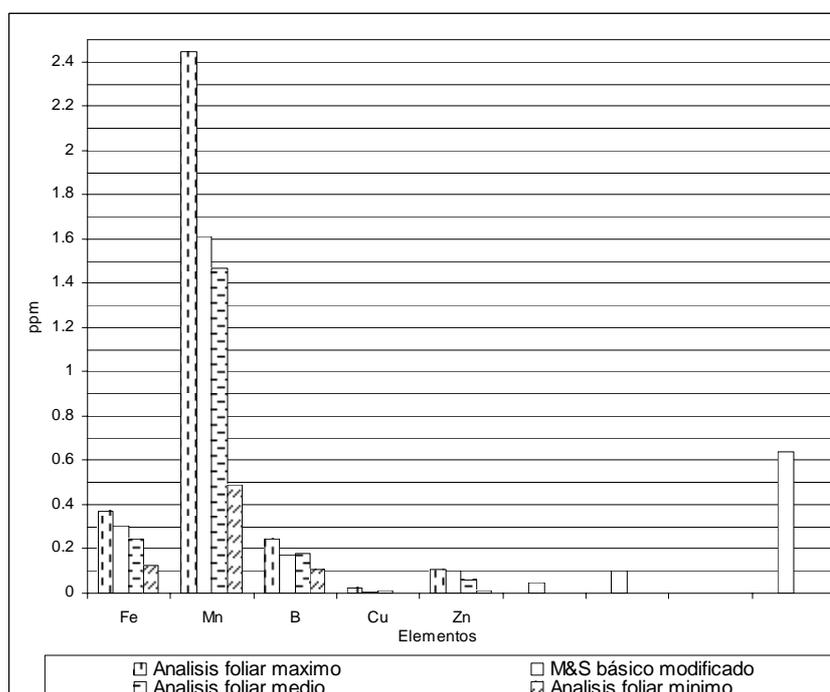
	COMPUESTO	ELEMENTO	PESO ATÓMICO (gr/MOL)	NÚMERO ATÓMICO (MOL)	gr DE ELEMENTO	gr DE ELEMENTO/gr DE COMPUESTO	PESO FORMULA (gr)	gr DE ELEMENTO DESEADO/gr DE COMPUESTO REQUERIDO	gr DE COMPUESTO REQUERIDO/ lt	mg DE COMPUESTO REQUERIDO/ lt	[X]	gr DE COMPUESTO POR VOLUMEN DE SOLUCIÓN CONCENTRADA	ml DE SOLUCIÓN CONCENTRADA	
MACRO (A)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	N	14.006	2	28.012*	0.349972389**		0.0314975***						
		H	1.0079	4	4.0316	0.050369438		0.0314975						
O		15.999	3	47.997	0.599658173									
MACRO (A)	KNO <sub>3</sub>	K	39.102	1	39.102	0.386746452	80.0406	0.0773493	0.09000	90.000	25	0.22500	100.00	
		N	14.006	1	14.006	0.138529252		0.0277059						
		O	15.999	3	47.997	0.474724297	101.105		0.20000	200.000	25	0.50000	100.00	
MACRO (B)	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Ca	40.06	1	40.06	0.272525164		0.0572303						
		Cl	35.453	2	70.906	0.48236818		0.1012973						
		H	1.0079	4	4.0316	0.027426671	146.9956		0.21000	210.000	25	0.52500	100.00	
		O	15.999	2	31.998	0.217679985								
	MACRO (B)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K	39.102	1	39.102	0.287331321		0.0057466					
			H	1.0079	2	2.0158	0.014812605							
MACRO (C)	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	P	30.973	1	30.973	0.227597386		0.0045519						
		O	15.999	4	63.996	0.470258688	136.0868		0.02000	20.000	25	0.05000	100.00	
		Mg	24.312	1	24.312	0.098638567		0.0049319						
		S	32.064	1	32.064	0.130089956		0.0065045						
MICRO (A)	KI	O	15.999	11	175.989	0.714021996			0.05000	50.000	25	0.12500	100.00	
		H	1.0079	14	14.1106	0.05724948	246.4756							
MICRO (A)	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	K	39.102	1	39.102	0.232747229		0.0001932						
		I	128.9	1	128.9	0.767252771	168.002	0.0006368	0.00083	0.830	1,000	0.04150	50.00	
	MICRO (B)	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	Na	22.989	2	45.978	0.190036025		0.0000475					
			Mo	95.94	1	95.94	0.396538697		0.0000991					
MICRO (B)	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	O	15.999	6	95.994	0.39676189			0.000250	0.250	1,000	0.02500	100.00	
		H	1.0079	4	4.0316	0.016663388	241.9436							
		MICRO (B)	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Cu	63.54	1	63.54	0.254491857		0.0000064				
				S	32.064	1	32.064	0.128423464		0.0000032				
	MICRO (B)	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	O	15.999	9	143.991	0.576716038			0.000025	0.025	5,000	0.01250	100.00
			H	1.0079	10	10.079	0.040368641	249.674						
MICRO (B)			CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Co	58.933	1	58.933	0.247692787		0.0000002				
				Cl	35.453	2	70.906	0.298014776		0.0000003				
MICRO (C)	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	H	1.0079	12	12.0948	0.050833908			0.000001	0.001	5,000	0.00050	100.00	
		O	15.999	6	95.994	0.403458528	237.9278							
		MICRO (C)	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	Zn	65.37	1	65.37	0.227347343		0.0001023				
				S	32.064	1	32.064	0.111513924		0.0000502				
	MICRO (C)	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	O	15.999	11	175.989	0.612064121			0.00045	0.450	1,000	0.04500	100.00
			H	1.0079	14	14.1106	0.049074612	287.5336						
SOLUCIÓN Fe	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	H	1.0079	3	3.0237	0.0489021			0.00100	1.000	1,000	0.10000	100.00	
		B	10.811	1	10.811	0.174845589	61.8317	0.0001748						
		O	15.999	3	47.997	0.776252311								
		SOLUCIÓN Fe	Na <sub>2</sub> · EDTA	Mn	54.238	1	54.238	0.322245248		0.0016112				
S	32.064			1	32.064	0.190502445		0.0009525						
VITAMINA	Acido nicotínico	O	15.999	5	79.995	0.475275796			0.00500	5.000	1,000	0.50000	100.00	
		H	1.0079	2	2.0158	0.01197651	168.3128							
		VITAMINA	Piridoxina-HCl	Fe	55.847	1	55.847	0.20088083		0.0003013				
				S	32.064	1	32.064	0.115333732		0.0001730				
VITAMINA	Tiamina-HCl	O	15.999	11	175.989	0.63302982	278.0106		0.00150	1.500	25	0.00188		
		H	1.0079	14	14.1106	0.050755619			0.00201	2.011	25	0.00251	50.00	
VITAMINA	Glicina							0.00050	0.500	1,000	0.02500	50.00		
								0.00050	0.500	1,000	0.02500	50.00		
VITAMINA	Myo-Inositol							0.00010	0.100	1,000	0.00500	50.00		
								0.00200	2.000	1,000	0.10000	50.00		
					* 28.012gr N = $\frac{14.006\text{gr N}}{\text{mol}} \times 2 \text{ mol}$									
					** 0.349972 gr N/gr NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = $\frac{28.012\text{gr N}}{80.046\text{gr NH}_4\text{NO}_3}$									
								*** 0.031497 gr N = $\frac{0.34997\text{gr N}}{\text{gr NH}_4\text{NO}_3} * 0.0900\text{gr NH}_4\text{NO}_3$						

Fuente: Aspucac Axpucac, José Raúl. 2003. y cálculos basados en Rosenberg y Epstein (34).



Fuente: Aspuaca Axpuc, José Raúl. 2003.

Figura 15A: Comparación de concentraciones en ppm de macro nutrientes de elementos que constituyen el medio de cultivo "M&S básico modificado", y el rango máximo, mínimo y medio, basados en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2).



Fuente: Aspuaca Axpuc, José Raúl. 2003.

Figura 16A: Comparación de concentraciones en ppm de micro nutrientes de elementos que constituyen el medio de cultivo "M&S básico modificado", y el rango máximo, mínimo y medio, basados en el rango óptimo de nutrientes establecidos en análisis foliares de persimón, (cuadro 2).